PARIJS

N° d'enregistrement au C.N.R.S. :

THESE de DOCTORAT D'ETAT

ès Sciences Naturelles

présentée

à L'UNIVERSITE PIERRE et MARIE CURIE

par

Danielle Laval-Martin

pour obtenir le grade de DOCTEUR ès SCIENCES

sujet de thèse :

Dualite structurale, biochimique et fonctionnelle des plastes des deux régions du fruit de Lycopersicum esculentum var. cerasiforme.

Evolution de ces plastes au cours de la maturation.

soutenue le : 15 septembre 1975

devant le jury composé de :

M.	R. ULRICH	Président
Mme.	M. LEFORT TRAN	Examinateurs
M.	C. COSTES	
M.	P. MAZLIAK	
M.	R. REMY	

N° d'enregistrement
au C.N.R.S. :

THESE de DOCTORAT D'ETAT
ès Sciences Naturelles
présentée

à L'UNIVERSITE PIERRE et MARIE CURIE

par

Danielle Laval-Martin

pour obtenir le grade de DOCTEUR ès SCIENCES

sujet de thèse :

Dualite structurale, biochimique et fonctionnelle des plastes des deux régions du fruit de Lycopersicum esculentum var. cerasiforme.
Evolution de ces plastes au cours de la maturation.

soutenue le : 15 Septembre 1975

devant le jury composé de :

M.	R . ULRICH	Président
Mme.	M . LEFORT TRAN	Examinateurs
M.	C . COSTES	
M.	P . MAZLIAK	
M.	R . REMY	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT PROPOS

Le souvenir ou la présence des êtres que j'aime m'ont, en toute circonstance, aidée à poursuivre ma tâche. Ce mémoire en est une preuve tangible : Je le leur dédie.

Monsieur le Professeur ULRICH, dans le laboratoire duquel, entourée d'excellents camarades, j'ai appris les difficultés et les joies que procure un travail de recherche, m'a proposé mon sujet. Qu'il en soit profondément remercié. Je lui dois, grâce à toute son indulgence pour mon caractère trop indépendant et à toute sa compréhension, de m'avoir permis de développer ce sujet dans une voie "déviationiste" par rapport à la ligne générale des recherches de son groupe. Je lui dois également, grâce à la confiance qu'il m'a toujours témoignée, les joies permanentes que me procure, depuis dix ans, mon travail d'enseignant à l'Université Pierre et Marie Curie.

Monsieur le Professeur ULRICH préside mon Jury. Je lui témoigne ici toute ma gratitude d'avoir accepté la responsabilité de rester jusqu' à ce jour, mon Maître.

Madame le Professeur LEFORT-TRAN m'a accueillie dans son laboratoire afin que j'y entreprenne des études ultrastructurales. Son ouverture d'esprit vis à vis de nombreux problèmes, sa bienveillance et l'animation scientifique qu'elle sait faire règner dans le laboratoire qu'elle dirige, expliquent pourquoi je lui ai demandé de consentir à guider le développement de mes travaux. Qu'elle soit ici assurée de ma profonde reconnaissance, de mon amitié et qu'elle accepte tous les remerciements que je lui dois pour les directives précieuses qu'elle m'a prodiguées, pour l'intérêt qu'elle a porté à mes recherches, pour le temps qu'elle m'a consacré ainsi que pour les moyens matériels qu'elle m'a accordés.

Monsieur le Professeur COSTES a accepté avec beaucoup d'obligeance d'examiner et de critiquer ce mémoire. Qu'il soit assuré de ma gratitude pour les suggestions nombreuses qu'il m'a faites et desquelles j'espère avoir su tenir compte.

Monsieur le Professeur MAZLIAK m'a, en cette occasion, comme depuis que nous "enseignons ensemble", témoigné toute sa confiance et sa sympathie. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et qu'il sache en outre que c'est grâce à son enseignement de 3e cycle qu'est né mon intérêt pour les lipides.

Monsieur REMY a bien voulu juger mon travail. Je demande, au spécialiste des protéines membranaires plastidiales, son indulgence quant aux renseignements modestes que mon travail apporte dans ce domaine et je le remercie profondément du temps qu'il a consacré à l'examen de mes données.

Les analyses détaillées des caroténoïdes ont été faites en collaboration. Je dois ici remercier Monsieur le Professeur MONEGER pour la camaraderie dont il a fait preuve à mon égard et rendre hommage à l'efficacité expérimentale de J. QUENNEMET.

Sans les nombreuses discussions amicales avec J. DIAMOND, G. DUBERTRET et A. TREMOLIERES, durant lesquelles ont été décidées des manipulations communes, certains contrôles n'auraient pas été possibles. Cette partie de nos résultats donnera lieu ultérieurement à une publication en collaboration.

Madame M. POUPHILE m'a enseigné avec une patience et une minutie exemplaires, les délicates techniques de la microscopie électronique. Qu'elle reçoive ici l'expression de ma profonde amitié.

Mademoiselle C. IANES a été la collaboratrice technique de mes expériences ; elle a contribué à l'achèvement de cette étude par la qualité de son travail, son dévouement et l'amitié inlassable qu'elle m'a témoignée. Dans la préparation des figures de ce mémoire elle a exprimé son goût et sa patience.

Mes remerciements s'adressent aussi à :

- J. RATEAU qui m'a aidé de sa collaboration technique au tout début de ce travail.

- F. AMBARD-BRETTEVILLE, C. MAILLEFER, C. BUNOUST et A. SANTA-MARIA pour l'amitié qu'elles m'ont témoignée et la sympathie avec laquelle elles m'ont parfois aidée.

- A. VERGNES et A. JOANNON pour la qualité de leurs exécutions photographiques.

- M. RACLIN et L. ALBOT pour la dactylographie de ce manuscrit et à Madame BRAUN et son équipe pour la diligence dont elles ont fait preuve pour reproduire ce mémoire.

Tous les membres du laboratoire ont toujours manifesté à mon égard camaraderie et gentillesse. Qu'ils en soient remerciés, puisqu'un travail de thèse est aussi un travail d'équipe.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION 1

II. MATERIEL ET TECHNIQUES 5

1. MATERIEL 5

1.1 - Fruits 5
1.2 - "Chair" et "Pulpe" 5
1.3 - Feuilles 7
1.4 - Matériel membranaires chloroplastique et chromoplastique 7

2. TECHNIQUES 10

2.1 - Techniques cytologiques 10
2.1.1. - Coupes et inclusions 10
2.1.2. - Cryodécapage 10

2.2 - Techniques d'analyses pigmentaires 10
2.2.1. - Analyse des chlorophylles 10
2.2.2. - Analyse des caroténoïdes 10

2.3 - Techniques d'analyses protéiques 11
2.3.1. - Analyse quantitative des protéines 11
2.3.2. - Analyse qualitative des polypeptides membranaires plastidiaux 11

2.4 - Techniques d'analyses des lipides 12
2.4.1. - Analyse qualitative des classes lipidiques 12
2.4.2. - Analyse quantitative des acides gras totaux 12

2.5 - Mesures d'échanges gazeux respiratoires 13

2.6 - Analyses photosynthétiques 13
2.6.1. - Mesure de l'intensité photosynthétique nette 13
2.6.2. - Mesures spectrophotométriques des activités partielles du Photosystème I et du Photosystème II, in vitro 15
2.6.2.1. - Détermination de l'activité de Hill 15

2.6.2.2. - Détermination du pouvoir de réduction du rouge de méthyle par les chloroplastes 16

2.6.3. - Mesure de l'activité photochimique du Photosystème II par enregistrement des cinétiques d'induction de la fluorescence, en présence de DCMU - in vivo 16

2.6.4. - Détermination des activités RuDP et PEP carboxylasiques 19

III. RESULTATS 21

1. RESULTATS PRELIMINAIRES 21

2. EVOLUTION PIGMENTAIRE 21

3. EVOLUTION DES STRUCTURES 24

3.1 - Mise en évidence, par cryodécapage, de l'évolution des chloroplastes en deux types de chromoplastes chez le fruit mur 24

3.2 - Expériences de maturation à 30°C 24

3.3 - Conclusions 24

4. COMPOSITION DES PLASTES 25

4.1 - Analyse des lipides 25

4.1.1. - Classes lipidiques 25

4.1.2. - Analyse des acides gras totaux 28

4.2 - Analyse qualitative des protéines 30

4.3 - Conclusions 32

5. ACTIVITE DES TISSUS 37

5.1 - Respiration 37

5.2 - Assimilation nette de CO_2 37

5.2.1. - Fixation de CO_2 à l'obscurité 37

5.2.2. - Fixation de CO_2 à la lumière 37

5.3 - Conclusions 38

6. ACTIVITES PHOTOSYNTHETIQUES DU FRUIT PAR REFERENCE A CELLE DE LA FEUILLE 39

6.1 - Photosynthèse nette 39

6.1.1. - Fixation de CO_2. Efficacité photosynthétique 39

6.1.2. - Activités RuDP et PEP carboxylasiques 41

6.2 - Photosynthèse partielle 43

6.2.1. - Analyse des activités des photosystèmes I et II 43

6.2.2. - Cinétique d'induction de fluorescence du photosystème II 45

6.3 - Conclusions 46

IV. CONSIDERATIONS GENERALES 49

1. REMARQUES TECHNOLOGIQUES 49

2. LA MATURATION ET LA TRANSFORMATION STRUCTURALE DES CHLOROPLASTES EN CHROMOPLASTES 52

2.1 - Chloroplastes 52

2.2 - Différents types de chromoplastes 52

3. LA MATURATION ET LES MODIFICATIONS PIGMENTAIRES 55

4. LES CHLOROPLASTES DU FRUIT VERT 58

4.1 - Modèles membranaires 59

5. CONCLUSIONS 72

V. BIBLIOGRAPHIE 74

ABBREVIATIONS UTILISEES

F : feuille

CV : "chair" verte

CM : "chair" mure

PV : "pulpe" verte

PM : "pulpe" mure

KD : kiloDaltons

v : volume

h : heure

mn : minute

PEP : phosphoénolpyruvate

RuDP : ribulose 1,5-diphosphate

$NADP^+$, $NADPH + H^+$: (forme oxydée, forme réduite) nicotinamide dinucléotide phosphate

ATP : adénosine triphosphate

FAD, $FADH_2$: (forme oxydée, forme réduite) flavine adénine dinucléotide phosphate

CoA : coenzyme A

SDS : dodecylsulfate

PPO : 2,5 diphenyloxazole

POPOP : 1-4 Di (2-5 phényloxazolyl benzène)

DCMU : 3 (3,4 - dichlorophényl) - 1,1 - diméthylurée

FT : fluorescence totale du PS II

FV : fluorescence variable photosystème II

FC : fluorescence constante photosystème II

T 1/2 : temps de demie montée de la fluorescence variable photosystème II

I. INTRODUCTION

L'expression la plus banale de la maturation de beaucoup de fruits est le changement de coloration de leur péricarpe. Ce fait a souvent constitué un contrôle du degré de maturité (SIDWELL et coll. (109), GARDNER (36), CLIJSTERS (16)), du moment opportun de la récolte (HALL (41)) ou de la qualité de certains fruits (THOMPSON (118)). Ces transformations pigmentaires ont parfois été étudiées avec précision. Elles sont de deux sortes : d'une part et en relation avec la température de maturation, une disparition des pigments chlorophylliens (WORKMAN (131), LAVAL-MARTIN (66)(68)) ; d'autre part une évolution des caroténoïdes (MONEGER (91), AUDIGIE (5), GALLER et MAC KINNEY (35)). A ce sujet, les auteurs ont mentionné la possibilité d'un simple démasquage des pigments jaunes lors de la disparition des chlorophylles (AUDIGIE (5)).

Des transformations structurales évidentes interviennent également au cours de la maturation. Il s'agit par exemple des modifications qui conduisent à l'apparition des chromoplastes dans les cellules du péricarpe. L'origine de ce type d'organite, décrit dès 1883 par MEYER (89) comme par SCHIMPER (108) a été longtemps discutée. Si STEFFEN et WALTER (116), reprennant la suggestion de SAVELLI (107) parlaient d'une filiation directe menant du chloroplaste au chromoplaste, une autre école n'admettait la génèse des chromoplastes qu'à partir d'une classe donnée de leucoplastes (FREY-WYSSLING et KREUTZER (32)(33), FREY-WYSSLING et SCHWEGLER (34)) attribuant ainsi aux chromoplastes une évolution différente de celle des chloroplastes sans passage possible des uns aux autres. Il a récemment été décrit, dans divers matériels, dont le nôtre (LAVAL-MARTIN (72)) la transformation continue du chloroplaste en chromoplaste (LANCE-NOUGAREDE (65), GEROLA et al. (37), ROSSO (105)(106), SPURR et HARRIS (115), HARRIS et SPURR (45)).

Des variations dans les phénomènes métaboliques ont également été étudiées au cours de la maturation. Il s'agit principalement des études respiratoires qui ont conduit à la mise en évidence de la crise climactérique (BIALE and SOLOMOS (11)) dans des fruits dont la coloration est due aux caroténoïdes. L'assimilation du gaz carbonique et son influence relativement au catabolisme respiratoire, lors des transformations du fruit ont particulièrement intéressé BEAN et TODD (7), BEAN and coll. (6).

Ces deux dernières années, des travaux portant sur la Pomme ont permis, l'observation, dans les tissus internes, de chloroplastes à structure différente de celle des chloroplastes de l'épiderme (PHAN (100)) et qui sont métaboliquement actifs (PHAN (101)) ; selon CLIJSTERS (16) cette activité des chloroplastes des fruits influencerait la composition biochimique des tissus.

Afin d'approfondir les données d'une étude préliminaire publiée en 1969 (LAVAL-MARTIN (69)), nous avons choisi d'étudier en détail les caractéristiques plastidiales du fruit de la Tomate cerise (Lycopersicum esculentum var. cerasiforme, DUN A. GRAY). A chacun des dix stades d'évolution du fruit envisagé, la "pulpe" (région interne du fruit entourant les graines et de consistance gélifiée) et la "chair" (région externe du péricarpe, de consistance plus charnue) ont été distinguées afin que notre étude soit plus précise. Nous avons alors mis en évidence au cours de la croissance puis de la maturation du fruit, les transformations qualitatives et quantitatives des teneurs pigmentaires ; l'évolution parallèle des ultrastructures infraplastidiales et les capacités de fixation globale du CO_2, à l'intérieur de chacun des deux types de tissus.

Les résultats déjà publiés font état d'une dualité marquée entre les deux parties interne et externe du fruit.

Ces deux zones présentent au cours de la maturation des compositions pigmentaires très différentes (LAVAL-MARTIN et coll. (70)(71)(73)). Dans chacune d'elle, se produit une accumulation de caroténoïdes, tandis que disparaissent les chlorophylles. La teneur en pigments totaux présents dans la "pulpe" et rapportée à un fruit, diminue malgré une accumulation nette de β-carotène ; la "chair" par contre, en fin de maturation, après la disparition totale des pigments chlorophylliens, est 5 à 6 fois plus riche en pigments totaux qu'elle ne l'était en fin de croissance. Cette région externe du fruit s'enrichit en effet simultanément d'une quantité de β-carotène comparable à celle de la "pulpe" et d'environ dix fois plus d'un nouveau pigment le lycopène et de l'un de ses précurseurs le phytofluène.

L'examen ultrastructural des plastes des deux régions du fruit (LAVAL-MARTIN (72)) a montré que, durant les phases de croissance de l'organe, les chloroplastes se différencient à partir de proplastes. Ces

chloroplastes de forme souvent sphérique, sont très riches en empilements granaires et surtout moins pourvus en grains d'amidon que les chloroplastes de feuille. Aux stades ultérieurs de la maturation les observations faites en cryodécapage afin de préserver in situ les pigments extractibles par les solvants nécessaires à la deshydratation, ont permis, là encore, la mise en évidence d'une dualité structurale, des plastes des deux tissus envisagés.

Les chloroplastes de la "pulpe" évoluent en chromoplastes sphériques, de taille peu différente de celle des chloroplastes dont ils dérivent et présentant de volumineux globules. Simultanément, dans la "chair" les chloroplastes donnent naissance à de grands chromoplastes allongés, renfermant à la fois des globules mais aussi de larges cristaux, aisément clivables lors du cryodécapage. Ces observations nous ont permis d'avancer l'hypothèse selon laquelle ces accumulations de caroténoïdes (β-carotène sous forme de globules sphériques et lycopène sous forme de larges lames cristallines) semblent s'effectuer, dans le plaste, à l'intérieur de membranes qui ne seraient autres que celles d'anciens thylacoïdes.

Ce mémoire rapporte, outre les résultats précédemment publiés, diverses données biochimiques et fonctionnelles récentes. Certaines qui comparent les constituants protéiques et lipidiques des membranes des chloroplastes du fruit adulte vert et des chromoplastes du fruit mûr, tendent à confirmer l'hypothèse, basée sur nos observations ultrastructurales, sur l'origine des membranes bordant les inclusions de pigments caroténoïdes. Selon cette hypothèse la disparition des chlorophylles entrainerait à l'intérieur des membranes des thylacoïdes, des modifications telles que les caroténoïdes abondemment synthétisés seraient désormais incapables de s'y intégrer et seraient alors relachés dans les anciens lumens.

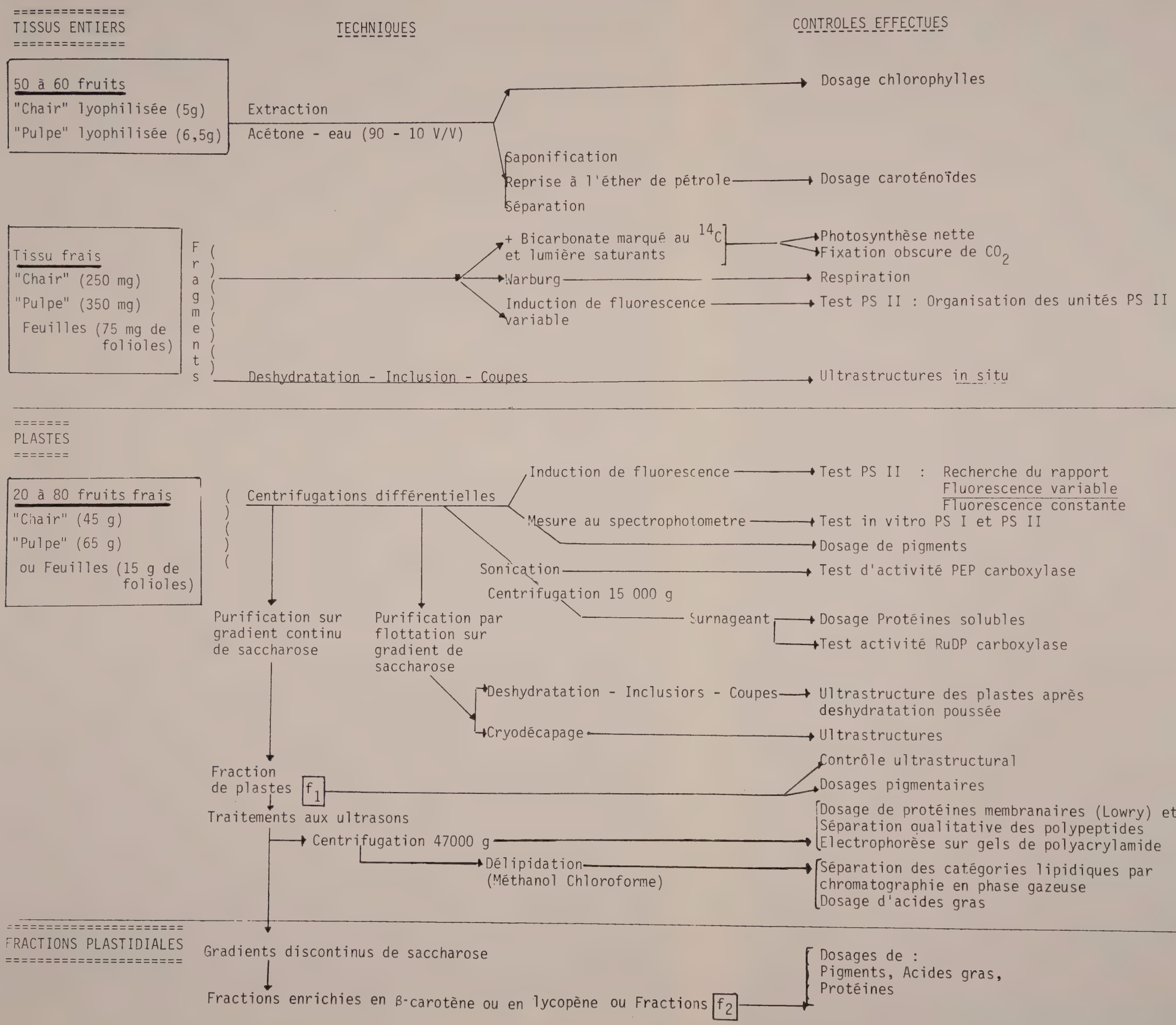
La dualité structurale semble confirmée par une dualité métabolique évidente entre les tissus des deux zones du fruit. Lors de nos contrôles, portant sur les tissus excisés des fruits le tissu le plus externe a toujours manifesté des activités métaboliques beaucoup plus élevées que celles du tissu interne. Il en est ainsi de l'intensité des carboxylations s'effectuant à l'obscurité, mais surtout des

intensités respiratoires et plus encore des intensités de fixation nette de CO_2 à la lumière.

Nous avons tout particulièrement cherché à approfondir ce dernier point qui révélait une dualité importante au niveau des chloroplastes des parties interne et externe du fruit capables d'évoluer en deux types distincts de chromoplastes. Cette dualité qui se manifeste précocement dans les stades verts n'avait été décelée ni par les analyses ultrastructurales ni par celle des compositions pigmentaires.

L'étude des constituants lipidiques et protéiques des thylacoïdes n'a montré que peu de différence entre les deux tissus du fruit, par contre l'étude détaillée des divers paramètres photosynthétiques a permis la mise en évidence de caractéristiques différentes dans les chloroplastes de la "chair" et dans ceux de la "pulpe". Nous avons alors pu proposer une explication possible de l'activité photosynthétique très faible dans la "pulpe" et remarquablement élevée dans la "chair", par référence au matériel foliaire. Nous avons par ailleurs pu tracer des modèles représentatifs de la répartition dans les trois types de membranes photosynthétiques envisagés, tant des acides gras et des protéines que des chlorophylles et avons tenté d'y situer les unités photosystème II, dont nous avons déterminé les tailles et les nombres relatifs. Enfin des contrôles enzymatiques suggèrent que les chloroplastes des deux tissus du fruit renferment une PEP carboxylase active et que la "chair" peut présenter simultanément les voies de fixation du CO_2, selon les intermédiaires en C-3 et selon ceux en C-4. Cette dernière observation fournirait une explication supplémentaire de la haute efficacité photosynthétique de ce tissu.

TABLEAU I - Tableau présentant, pour chacun des contrôles effectués, la technique utilisée et le type de matériel auquel elle a été appliquée.



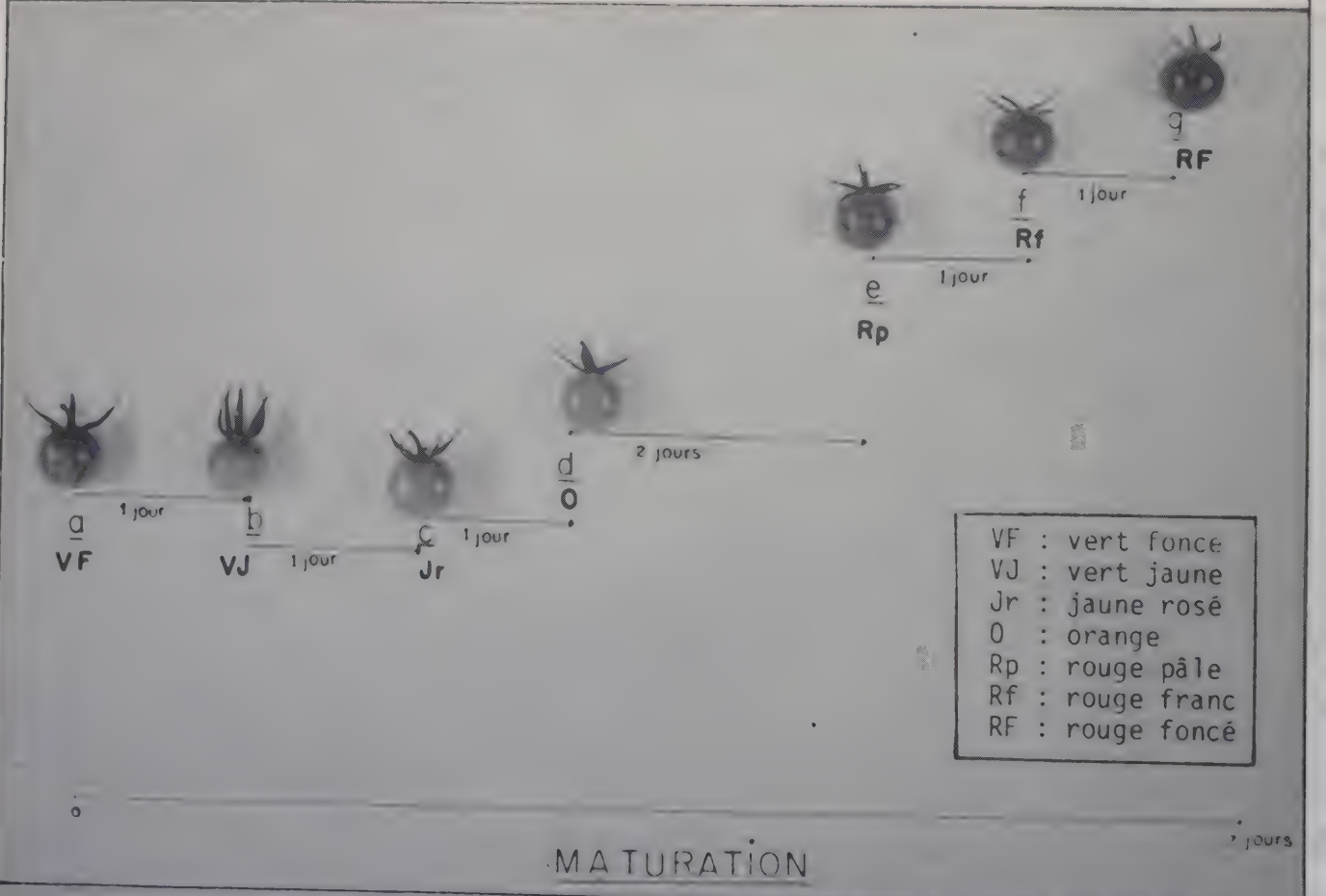


Figure 1 - Evolution des fruits au cours de la croissance et de la maturation.

II. MATERIEL ET TECHNIQUES

Nous avons effectué nos différentes études soit sur une population de fruits du même âge, soit sur un fragment de tissu, soit encore sur des plastes isolés plus ou moins purifiés, soit enfin sur des fractions isolées à partir de plastes purifiés puis cassés. Nous résumons dans le Tableau I , pour chacun des contrôles effectués, les techniques utilisées et le type de matériel auquel elles ont été appliquées.

1. - MATERIEL

1.1 - Fruits

Les fruits de Lycopersicum esculentum var. cerasiforme, Dun. A. Gray. ont été, suivant la saison et les phases du travail, obtenus sur pied au jardin expérimental du C.N.R.S. à Bellevue (fruits ayant servi aux analyses pigmentaires), en serre ou en super serre (humidité relative 50 à 55 %, jour de 16 h à 24°C et nuit de 8 h à 17°C), au Phytotron, C.N.R.S. de Gif sur Yvette. Durant leur croissance, les fruits verts ont été classés selon leur taille (fruits de 6 mm de diamètre à fruits verts adultes de 12 à 15 mm de diamètre), puis selon leur couleur durant la maturation (LAVAL-MARTIN, (69)). Nous présentons (Fig. 1) les divers stades étudiés et précisons la durée moyenne, en jours, nécessaire pour que s'effectue l'évolution d'un stade donné au stade ultérieur.

1.2 - "Chair" et "Pulpe"

Le fruit de Tomate qui se développe à partir d'un seul ovaire renferme des graines entourées d'une partie du péricarpe. Nous avons appelé "pulpe" cet ensemble gélifié de tissus, qui devient très fluide au cours de la maturation. Nous avons nommé "chair" la partie plus charnue du péricarpe, limitée extérieurement par la cuticule. Nos essais ont porté sur ces deux régions du fruit, séparées manuellement, à l'aide d'une spatule, après incision équatoriale du fruit.

Nous avons étudié l'évolution, durant la maturation, des poids frais et secs des deux régions précédemment définies (Fig. 2). Sur les très petits fruits de telles mesures auraient été entachées de trop

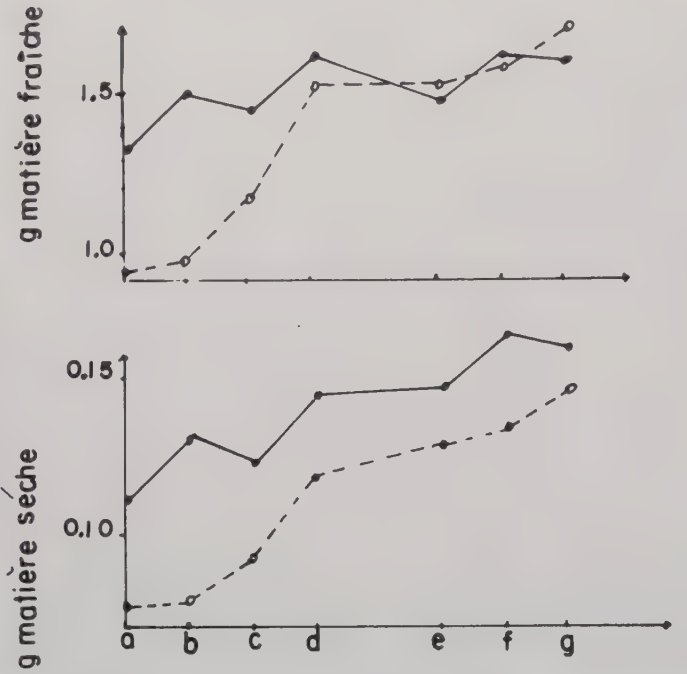


Figure 2 - Evolution des poids de matière fraîche et sèche de la "chair" et de la "pulpe" d'un fruit, durant la maturation. Chaque point expérimental correspond à une valeur moyenne déterminée à partir de lots de 40 à 60 fruits.

pulpe chair

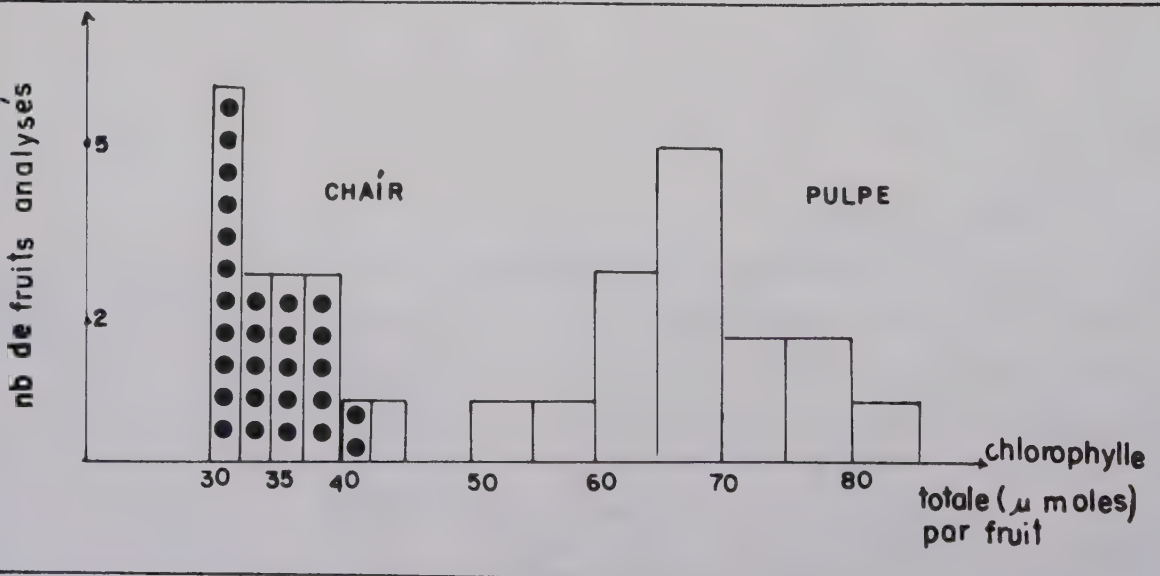


Figure 3 - Histogrammes des teneurs en chlorophylle totale de la "chair" et de la "pulpe" d'un fruit vert adulte représentatifs de l'hétérogénéité du matériel.

d'erreur par suite du mode de séparation des deux tissus.

L'hétérogénéité présentée par les tissus des fruits d'un stade donné est représentée Fig. 3 . Nous avons effectué des dosages sur les tissus d'un seul fruit du stade vert adulte, 16 fois à divers moments de la même année.

1.3 - Feuilles

Le matériel foliaire qui a servi de témoin pour toute la dernière partie du travail, a été prélevé sur les plants qui portaient les fruits. Les feuilles adultes, vert foncé, sans aucune trace de jaunissement, présentaient un poids unitaire moyen de 1,5 g et des dimensions d'environ 25 sur 13 cm.

1.4 - Matériel membranaire chloroplastique et chromoplastique

Certaines de nos analyses ont porté sur les membranes isolées de plastes purifiés. La préparation de telles fractions se fait, à 4°C, selon le procédé suivant :

- Le matériel végétal soigneusement lavé est broyé au Mouli-Persil (Moulinex) dans un tampon (SSFA) de pH 7,5 (50 mM en tris, 165 mM en sorbitol, 150 mM en saccharose et 25 µM en Ficoll 400).
- Le broyat est filtré sur 2 épaisseurs de gaze à beurre serrée, puis la gaze est pressée manuellement pour extraire le maximum de plastes.
- Le broyat est ensuite traité selon le protocole, Fig. 4 et 5.

Les plastes purifiés, lavés plusieurs fois dans du tampon 0,25 mM en phosphate, pH 7,5, sont cassés aux ultrasons (MSE, 30 secondes sous 8 Kcycles) dans un faible volume du même tampon. Les dosages biochimiques sont effectués sur le culot 47000 g de cette fraction. Cette dernière fraction cassée peut subir une nouvelle purification sur gradient semi continu de saccharose dans un tampon (SSFB), pH 7,5, (le tube contient de bas en haut 5 ml à 60 % de saccharose, 5 ml à 40 % puis 36 ml d'un gradient continu de 35 à 5 %). Dans ces conditions il est possible d'isoler des fractions enrichies en lycopène ou en β-carotène, ou encore des fractions de lamelles vertes f_2. (Fig. 5).

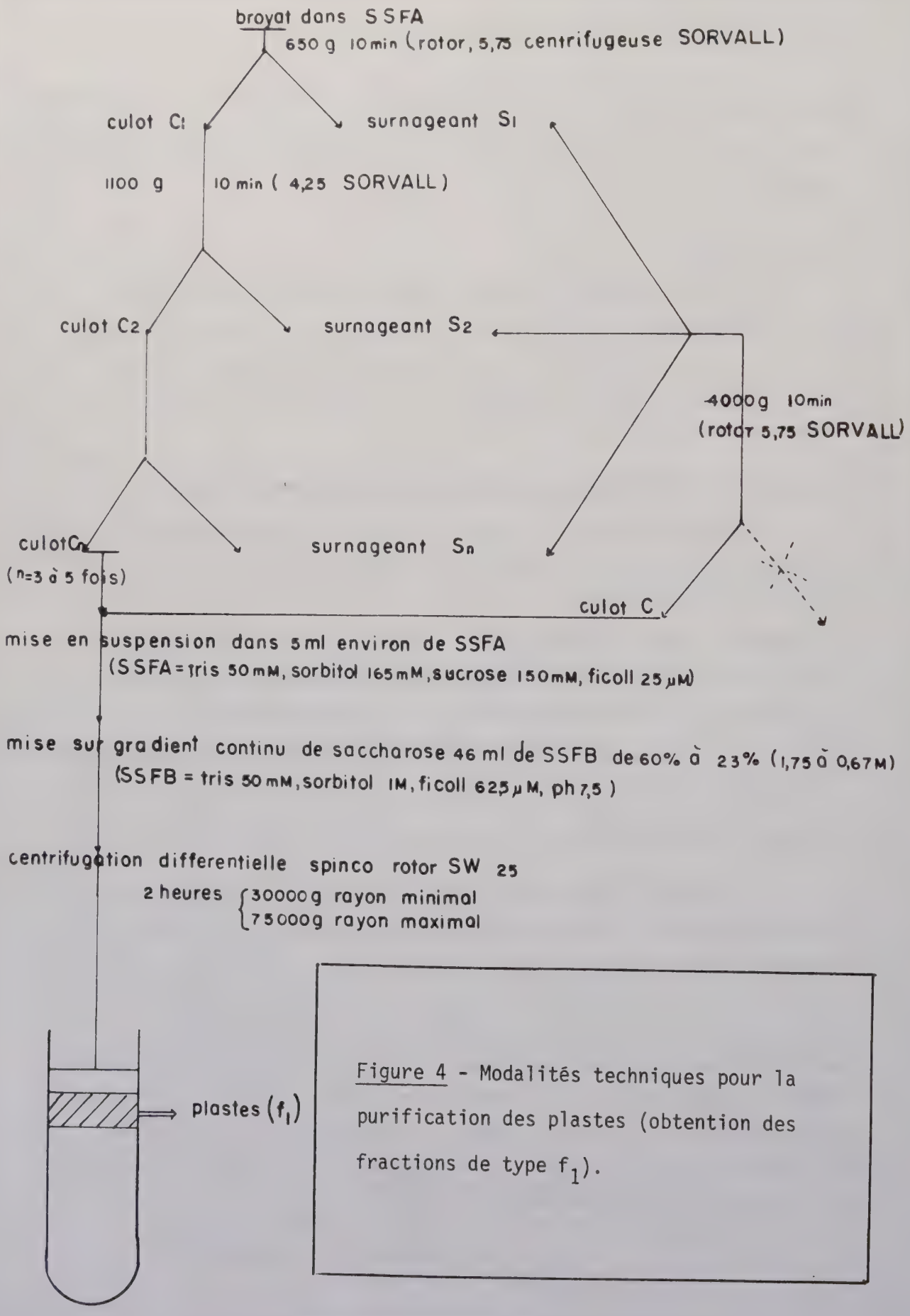
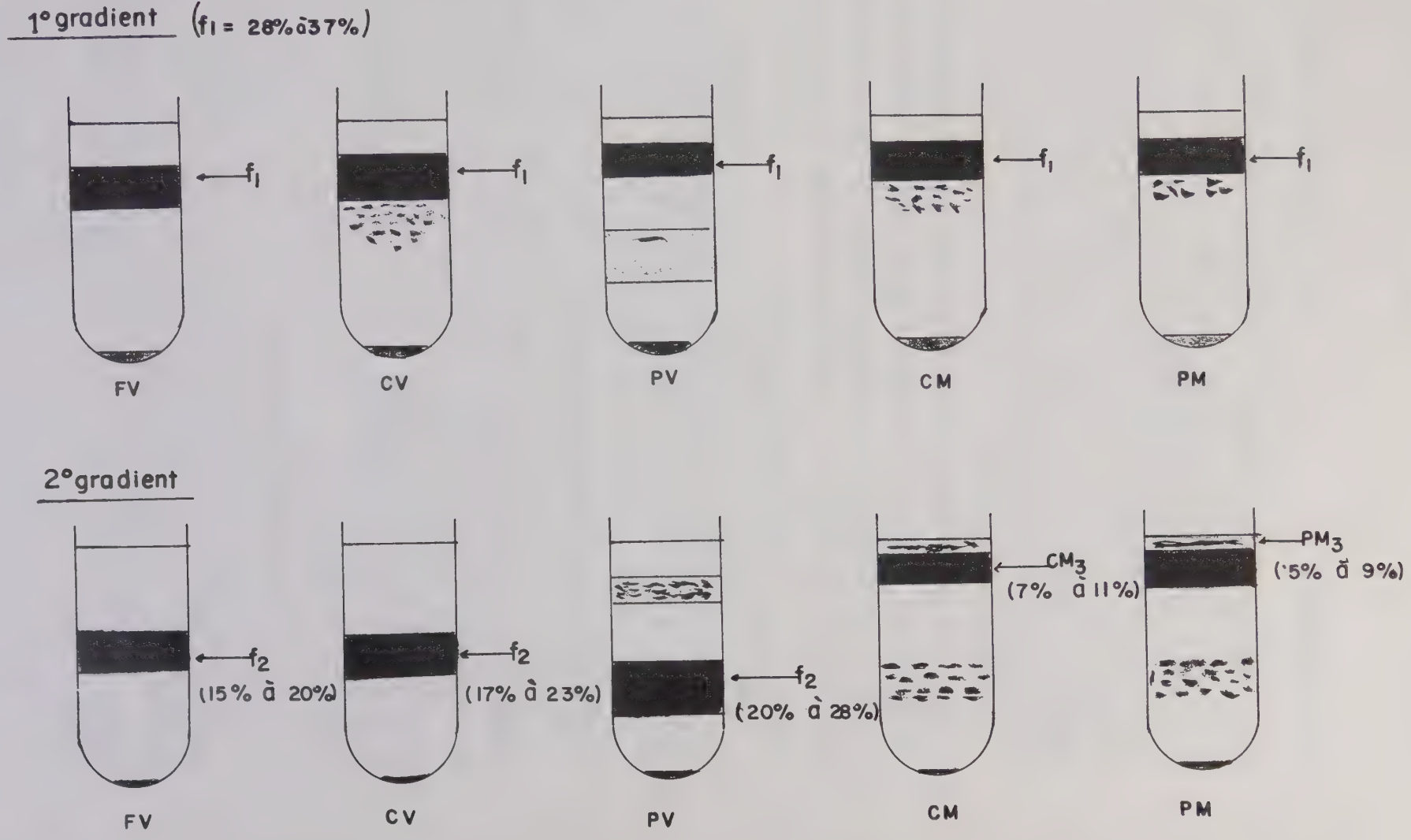


Figure 4 - Modalités techniques pour la purification des plastes (obtention des fractions de type f_1).

Figure 5 - Aspect des premiers gradients de purification des plastes situés dans la zone 25 à 35 % de saccharose (Fractions f_1). Feuille (F), "chair" verte adulte (CV) et mûre (CM), "pulpe" verte adulte (PV) et mûre (PM).

- Aspect des seconds gradients de purification de fractions de lamelles vertes (f_2), ou de fractions enrichies en β-carotène (PM_3) ou en lycopène (CM_3), obtenues à partir des plastes cassés (f_1).



2. - TECHNIQUES

2.1 - Techniques cytologiques

2.1.1. - Coupes et inclusions

Les méthodes utilisées sont classiques et ont été décrites en détail dans l'article : "Evolution des pigments et des plastes au cours de la maturation de la tomate "cerise". (LAVAL-MARTIN, (69)).

2.1.2. - Cryodécapage

La méthode est celle mise au point par MOOR (134) et a été décrite dans l'article : "La maturation du fruit de tomate "cerise" ; mise en évidence par cryodécapage, de l'évolution des chloroplastes en deux types de chromoplastes". (LAVAL-MARTIN, (72)).

2.2 - Techniques d'analyses pigmentaires

Les tissus ont été congelés à l'azote liquide, lyophylisés et conservés sous vide, à l'abri de la lumière, jusqu'au jour de l'extraction.

2.2.1. - Analyse des chlorophylles

Sur un extrait acétonoaqueux des pigments totaux, nous avons analysé les pigments chlorophylliens à l'aide d'une méthode cinétique de phéophytinisation contrôlée, spécialement mise au point (DELAPORTE et LAVAL-MARTIN,(20,21,22,23)) et permettant une détermination plus précise de la quantité de chlorophylle b que les méthodes habituellement utilisées (LAVAL-MARTIN, (67)).

2.2.2. - Analyse des caroténoïdes

A partir de l'extrait pigmentaire global dans l'acétone aqueuse, nous avons après saponification des pigments chlorophylliens, repris la fraction liposoluble dans l'éther de pétrole 40 - 60°C. Les caroténoïdes ont été séparés et dosés à l'aide d'un dispositif mis au point par MONEGER (92).

2.3 - Techniques d'analyses protéiques

2.3.1. - Analyse quantitative des protéines

Les dosages de protéines sont effectués selon LOWRY et coll. (80). Lorsqu'il s'agit de protéines membranaires, une délipidation à l'acétone aqueuse (90 - 10 V/V) puis une solubilisation par le SDS sont préalablement effectuées.

2.3.2. - Analyse qualitative des polypeptides membranaires plastidiaux

Les protéines membranaires plastidiales sont solubilisées à température ambiante pendant 1 h dans le dodecylsulfate 4 % (Matheson, Coleman et Bell : M.C.B. ou British Drug Houses : B.D.H.), puis 10 mn à 60°C après addition, V/V d'un mélange Tris HCl 62 mM, pH 6,8, 0,2 M en β - mercaptoéthanol, mélange contenant 20 % de glycérol. Un tel traitement solubilise totalement les protéines membranaires.

La séparation électrophorétique des protéines selon LAEMMLI (133), est effectuée sur gels de polyacrylamide en tubes de 4 mm de diamètre (acrylamide 10 % plus bis éthylène acrylamide 0,36 %) à l'aide d'un tampon Tris HCl 25 mM, glycine 190 mM, SDS 0,1 % ajusté à pH 8,4. L'électrophorèse d'un mélange initial de 100 à 150 µg de protéines dosées selon LOWRY et coll., dure environ 4 h à 20°C, sous 2 mA/gel. Les gels sont colorés au bleu de Coomassie (Sigma) puis différenciés et comparés par référence à des protéines témoins de poids moléculaires connus : sérum albumine bovine (68 000 daltons), ovalbumine (43 000 daltons), α - chymotrypsinogène (25 000 daltons) et cytochrome c (12 400 daltons). Les résultats présentés sont la moyenne de 3 électrophorèses au cours desquelles il a été, à chaque fois, effectué une séparation du mélange des protéines témoins : les trois courbes d'étalonnage représentant : log des poids moléculaires = f (distance de migration du polypeptide / distance de migration de l'ovalbumine, (43 KD)), sont confondues pour des polypeptides de poids moléculaires compris entre 12,5 et 51 KDaltons. A l'extérieur de ces limites les courbes expérimentales divergent. La détermination des poids moléculaires des différents polypeptides, caractérisés par leur mobilité relativement à la mobilité de l'ovalbumine est donc moins précise pour les espèces occupant des positions extrêmes sur les gels.

2.4 - Techniques d'analyses des lipides

Les lipides sont extraits selon la méthode de BLIGH et DYER (13). Au matériel membranaire plastidial est ajouté un volume v de méthanol, puis de deux fois v/2 de chloroforme (on homogénéise après chaque addition de solvant), on ajoute enfin v/2 d'eau. Une centrifugation de 10 mn à 5 000 rpm, permet de récupérer l'hypophase chloroformique qui contient les lipides et les pigments.

2.4.1. - Analyse qualitative des classes lipidiques

L'extrait chloroformique est déposé, sous courant d'azote, sur des plaques de chromatographie (20 x 20 cm) recouvertes de 0,25 mm de gel de silice et préalablement activées 30 mn à 110°C.

Deux solvants d'élution ont été utilisés :

Solvant 1 : V/V, chloroforme (50), acétone (20), méthanol (10) acide acétique (10), eau (5) (LEPAGE, (75)).

Solvant 2 : V/V, heptane (70), éther de pétrole 45-60°C (30) (MORRIS et coll., (93)).

L'exposition des plaques aux vapeurs d'iode permet la révélation de toutes les catégories lipidiques, la coloration prise par les taches est d'autant plus intense que les acides gras constituants sont plus insaturés. L'aspersion à la rhodamine et l'examen de la plaque en lumière ultra violette permettent l'identification des phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylinositol qui se colorent en rouge-jaune, des phospholipides acides, phosphatidylglycérol, diphosphatidylglycérol qui se révèlent en bleu et des galactolipides qui apparaissent en jaune très clair. L'aspersion à l'α - naphtol (0,5 %), suivie d'un séchage, puis d'une pulvérisation d'$H_2 SO_4$ (50 %), la plaque étant enfin chauffée à l'étuve conduit à une coloration violette pour les catégories lipidiques comportant des sucres dans leurs molécules (galactolipides, stérolglucosides). Enfin les catégories renfermant des acides aminés (phosphatidyléthanolamine, phosphatidylserine) sont identifiées grâce à la ninhydrine.

2.4.2. - Analyse quantitative des acides gras totaux

Faite par chromatographie en phase gazeuse, elle nécessite

une méthylation préalable des acides gras.

Une fraction de la solution lipidique, additionnée d'heptadécanoate de méthyle (absent dans les extraits naturels) pour permettre le dosage quantitatif ultérieur des acides gras, est évaporée à sec sous vide et reprise dans 4 ml de soude méthanolique à 2 %. Le tube bouché est chauffé à 65°C durant 15 mn pour permettre la saponification des acides gras. 3 ml de méthanol trifluorure de bore (14 %, Applied Sciences Lab.) sont ajoutés et portés à 65°C, 5 mn pour réaliser la méthylation. Après un refroidissement rapide, les esters méthyliques sont extraits par le pentane puis de l'eau est ajoutée pour séparer les phases.

Les esters méthyliques peuvent alors être séparés par chromatographie en phase gazeuse selon le procédé mis au point par MAZLIAK (86). La phase stationnaire est le butane diol succinate (BDS), qui sépare les différents acides gras selon la longueur de leur chaine et parmi ceux de la même série, selon le nombre de leurs doubles liaisons. Les volumes de rétention sont exploités selon la loi de JAMES et MARTIN (52) pour l'identification des acides gras. Les pourcentages sont calculés par triangulation de la surface du pic par rapport à la surface de la totalité des pics. Les mesures quantitatives se font également par triangulation et par référence à la surface du pic du témoin interne ajouté (en C_{17}). Le gaz vecteur est l'azote à un débit de 20 ml par minute, la température de la colonne est 200°C et celle de la chambre d'injection 240°C.

2.5 - Mesures d'échanges gazeux respiratoires

La détermination de l'intensité respiratoire des fruits a été faite par la méthode de Warburg, sur 1 g environ des tissus de "pulpe" ou de "chair" séparée en quatre tronçons pour un fruit et introduits dans des fioles sans tampon (PHAN, (101)). Les mesures ont été faites sur 30 mn, en présence de KOH à 25°C et à l'obscurité totale.

2.6 - Analyses photosynthétiques

2.6.1. - Mesure de l'intensité photosynthétique nette

Les mesures d'incorporation de $^{14}CO_2$, à l'obscurité et à la lumière, ont lieu dans une cuve thermostatée à 25°C, sous éclairement et en concentration de substrats saturants. Le matériel est tronçonné pour permettre une meilleure pénétration des substrats et une réponse physiologique optimale (JONES et OSMOND, (55)). La "chair" d'un demi fruit, qui pèse 400 mg en moyenne, est partagée en une cinquantaine de fragments de (4 x 4 x 0,5 à 1 mm) environ. La "pulpe" d'un demi fruit, de poids moyen 600 mg, est constituée de 30 morceaux de (4,5 x 3 x 1) à 1,5 mm environ. L'expérience est également faite sur une demi foliole sectionnée au niveau de la nervure principale, ce matériel pesant environ 100 mg est divisé en une centaine de morceaux de dimensions moyennes (4 x 2 x 0,1 mm). Les fragments sont placés, sans tampon, dans des petits erlens bouchés, immergés dans le bain thermostaté. Après équilibration de la température et 5 mn de pré-éclairement, dans la fiole sont injectés 0,5 ml d'un tampon pH 7,8, maintenu à même température, contenant 16 µmoles de Tris HCl, 1,6 µmoles de $MgCl_2$ et 30 µmoles de $NaHCO_3$ marqué au carbone 14 (1 Millicurie dans 2 ml, activité spécifique : 53,5 mCi pour 1 mM). Une lumière blanche, 400 à 750 nm, d'intensité saturante (140 $W.m^{-2}$) est délivrée pendant 45 mn. La réaction est arrêtée par addition de 3,5 ml de NCS (Tissue Solubilizer Co Amersham/ Searle). Les fioles sont laissées environ 17 h dans un bain-marie à 37°C afin d'assurer la dissolution des tissus.

Les comptages témoins sont effectués sur 50 µl du contenu des fioles déposés sur papier filtre et séchés sous une lampe infra-rouge. Les papiers sont introduits dans les flacons à scintillation, 0,5 ml de soude 0,1 N sont ajoutés afin d'éluer les produits radioactifs et 5 ml de liquide de Bray (1 litre complété au dioxane, 0,468 M en naphtalène, 18 mM en PPO et 0,55 mM en POPOP, 100 ml de méthanol et 20 ml d'éthylène glycol).

Après prélèvement des témoins, 0,5 ml d'acide acétique pur sont ajoutés au contenu des erlens, afin d'éliminer tout le CO_2 non fixé métaboliquement. A l'aide d'un compteur à scintillation liquide Nuclear Chicago Unilux II, on détermine la radioactivité fixée dans les aliquotes de 50 µl préparés et séchés comme précédemment (cette fois le séchage permet l'élimination du CO_2 non fixé et de l'acidité résiduels). Lors de ces manipulations nous avons négligé l'extinction différentielle

puisqu'un contrôle effectué sur un compteur Intertechnique a indiqué des extinctions très comparables pour tous les échantillons d'une même série. Le rendement du compteur est ici de 55 %.

2.6.2. - Mesures spectrophotométriques des activités partielles du Photosystème I et du Photosystème II, in vitro

Nous présentons sur le schéma de la photosynthèse, Fig. 6 d'après GOVINDJE et GOVINDJE (39) et BISHOP (12), les sites d'actions des donneurs et des accepteurs d'électrons que nous avons utilisés : 1,5 - diphénylcarbazide (DPC), 2,6 - Dichlorophénolindophénol (DCPIP) et rouge de méthyle (RM).

L'activité de Hill est mesurée d'abord en présence de DCPIP seul comme accepteur d'électrons puis on isole le transfert P 680 - Q - DCPIP en introduisant un donneur d'électrons, le DPC, qui intervient comme le schéma l'indique, après Z.

Le rouge de méthyle est utilisé comme test pour l'évaluation du pouvoir réducteur des chloroplastes ; en présence de DCMU qui découple les deux photosystèmes. Le couple ascorbate DCPIP agit comme donneur d'électrons au P 700, via cyt f et PC et le rouge de méthyle comme accepteur d'électrons après X, accepteur primaire du PS I.

2.6.2.1. - Détermination de l'activité de Hill

Les techniques décrites sont inspirées de techniques classiques (HOOBER et coll., (51)).

L'activité de Hill est mesurée spectrophotométriquement, sur des chloroplastes isolés, par photoréduction du DCPIP. Les tissus sont broyés dans du tampon de Jagendorf (0,05 M phosphate de sodium, pH 6,9, 0,4 M sucrose, 0,01 M chlorure de potassium). Les chloroplastes sont purifiés rapidement par centrifugation différentielle, puis traités aux ultrasons dans le même tampon. Le milieu de réaction contient, pour 3 ml : 0,2 µmoles de DCPIP et 1,0 ml du tampon de Jagendorf, contenant des chloroplastes en quantité équivalente à 5 à 30 µg de chlorophylle. La lumière d'excitation est fournie par une photolampe (Sylvania FAD 650 watts), filtrée par un filtre de transmission à 630 nm et 2 cm d'eau. Les mesures spectrophotométriques de réduction du DCPIP ont été

faites en lumière incidente saturante. Un filtre interférentiel ("DT Gruen", Balzers) est placé face au phototube d'un spectrophotomètre d'un Cary modèle 14, modifié pour permettre une illumination latérale du compartiment porte échantillon. Le coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 580 nm a été pris égal à 18,0 ml. $\mu mole^{-1}.cm^{-1}$. La lumière incidente saturante est précisée lors de la présentation des résultats.

2.6.2.2. - Détermination du pouvoir de réduction du rouge de méthyle par les chloroplastes

Pour cette réaction, les chloroplastes ont été préparés comme pour la réaction de Hill. Le milieu réactionnel était composé dans l'ordre et pour 3 ml de : 0,4 µmoles de rouge de méthyle sous forme de sel de sodium, 0,6 µmoles de DCPIP, 0,06 µmoles de DCMU, 1,35 ml de tampon de Jagendorf contenant des chloroplastes en quantité équivalente à 5 à 30 µg de chlorophylle, ainsi que 3,5 µmoles d'acide ascorbique. Un bulle à bulle d'azote était établi durant l'addition des plastes et de l'ascorbate. La lumière d'excitation est la même que celle utilisée pour la réduction du DCPIP et le filtre d'analyse est un filtre interférentiel ("DT Blau", Balzers). Le coefficient d'extinction molaire du rouge de méthyle, à 430 nm, est pris égal à 20,6 ml. $\mu mole^{-1}.cm^{-1}$.

Les éclairements lumineux ont été mesurés au luxmètre et au radiomètre "Yellow Springs".

2.6.3. - Mesure de l'activité photochimique du Photosystème II par enregistrement des cinétiques d'induction de la fluorescence, en présence de DCMU - in vivo.

L'unité photosynthétique système II est définie comme l'association d'environ 35 (MALKIN et KOK, (83)) à 55 (KELLY et SAUER, (58)) molécules de chlorophylles jouant le rôle de collecteur de photons, et d'un centre photochimique, constitué d'un donneur primaire d'électrons (Z), d'une chlorophylle particulière (P 680) et d'un accepteur primaire d'électrons (Q). L'énergie d'un photon capté par une unité, comportant un accepteur primaire Q dans sa forme oxydée, est convertie en pouvoir réducteur selon la réaction suivante :

Z. Chl. 680. Q ⟶ Z. Chl. 680* Q ⟶ Z^{+}. Chl. 680. Q^{-}

Z^{+} est réduit par photooxydation de l'eau et Q^{-} est normalement réoxydé par le transfert des électrons via la chaîne de transfert, vers le système I ; une nouvelle réaction photochimique sur ce centre est alors possible. En présence de DCMU, la réoxydation de Q^{-} est bloquée. L'énergie d'un photon capté par une unité PS II comportant un accepteur primaire Q dans sa forme réduite Q^{-}, ne pourra plus être utilisée pour une nouvelle réaction photochimique au niveau de ce centre et sera : soit transférée, par résonance à un centre voisin ouvert, soit restituée sous forme de fluorescence (JOLIOT et JOLIOT (53), DUYSENS et SWEERS (26)).

Dans de telles conditions, en présence de DCMU, la cinétique de réduction de l'ensemble des accepteurs primaires Q, par la lumière excitatrice, se traduira par une cinétique d'induction de fluorescence. Notons que la participation de la chlorophylle du photosystème I à l'émission de la fluorescence est très faible, et nous la négligeons.

Nous représentons sur le schéma Fig.7 l'aspect général de la cinétique d'induction de la fluorescence, analysé à $\lambda \geqslant 650$ nm (film masque Rubylith Amberlith Vlano + Wratten n° 20), après excitation du PS II par un éclairement faible, 40 $W.m^{-2}$ environ, compris dans une gamme de longueur d'onde de 400 à 600 nm (filtre bleu Schott BG 38-20 mm). La courbe s'inscrit entre les états : initial où tout Q est à l'état oxydé, et final, où tout Q est réduit (cas limite où toute l'excitation incidente est restituée sous forme de fluorescence).

L'amplitude de la fluorescence constante (FC), indépendante de l'état d'oxydo réduction de Q, est proportionnelle à la quantité de chlorophylles du PS II non efficaces dans le transfert des photons absorbés vers les centres photochimiques système II.

Quand l'ensemble des accepteurs Q est sous forme réduite (Q^{-}), l'amplitude de la fluorescence variable est maximale et correspond à l'ensemble des chlorophylles efficaces dans l'antenne. Le rapport Fluorescence variable/Fluorescence totale reflète donc la proportion des chlorophylles du PS II efficaces pour la photosynthèse.

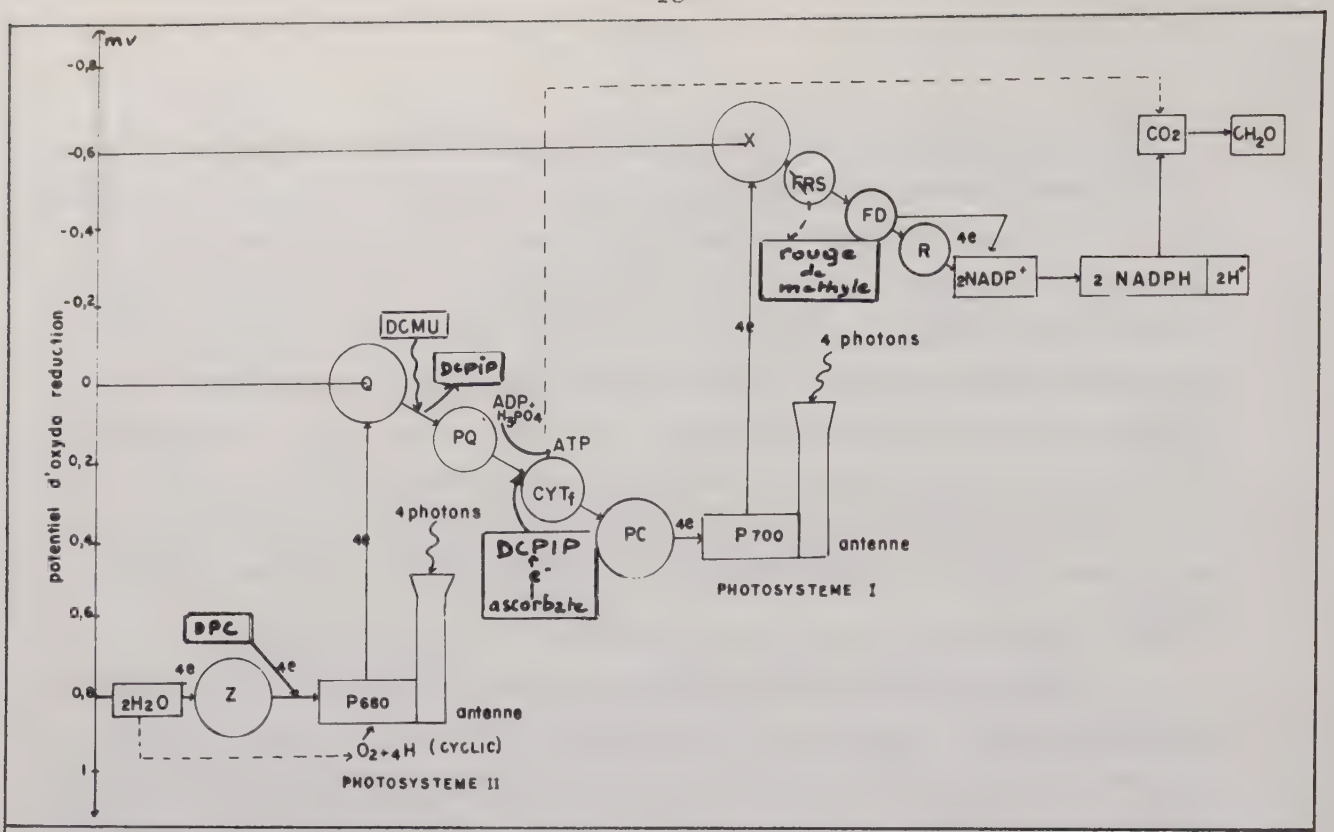


Figure 6 - Schéma des chaînes de transfert d'électrons dans la photosynthèse d'après GOVINDJE et GOVINDJE 1974). Q : accepteur primaire des électrons provenant du PS II ; PQ : plastoquinone ; Cyt.f : cytochrome f ; PC : plastocyanine ; X : accepteur primaire des électrons provenant du PS I ; FRS : substance réductrice de la ferredoxine (?) ; FD : ferredoxine ; R : ferredoxine $NADP^+$ réductase.
- Sites d'action de divers accepteurs et donneurs d'électrons exogènes (d'après BISHOP 1974). DPC : 1,5 - diphénylcarbazide ; DCPIP : 2,6 - dichlorophénolindophénol ; RM : rouge de méthyle ; et d'un inhibiteur de transfert des électrons le DCMU, DCMU : 3 (3,4 - dichlorophényl) - 1,1 - diméthylurée.

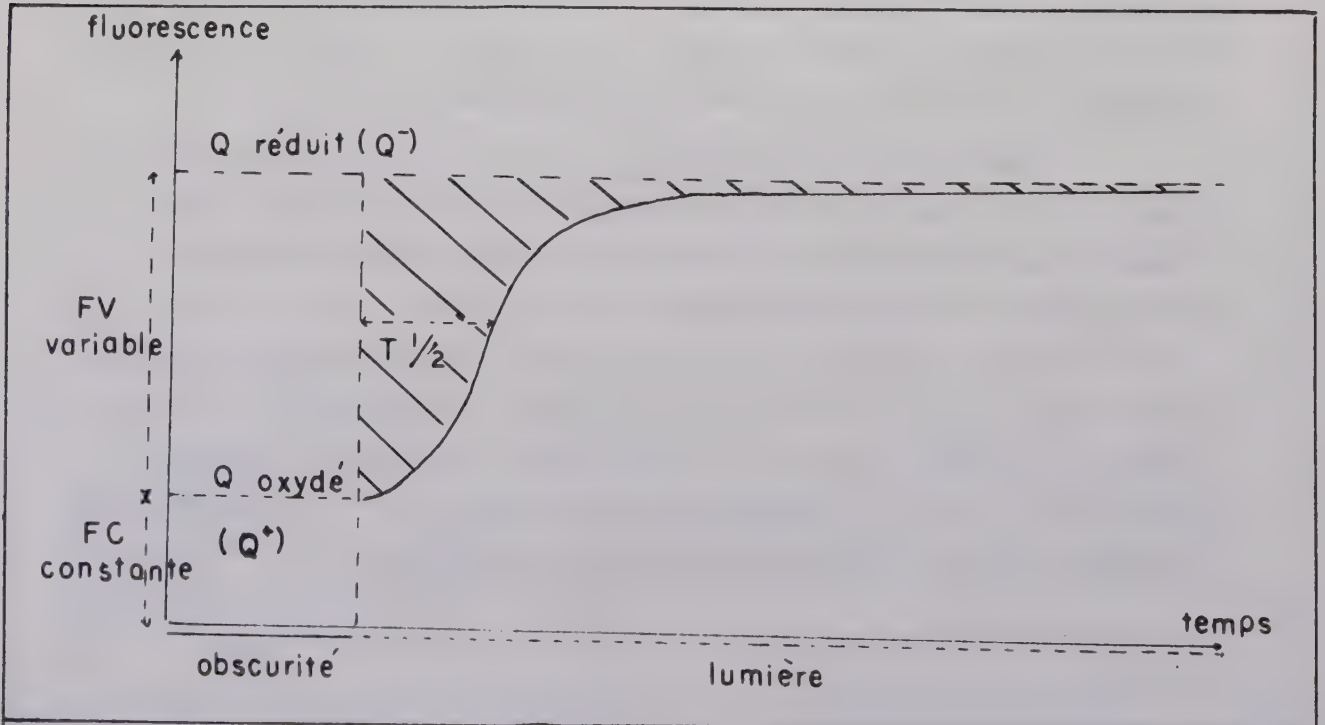


Figure 7 - Profil d'une cinétique classique de montée de la fluorescence variable du PS II, induite en présence de DCMU.

Le temps de montée de la fluorescence variable représente le temps nécessaire à la réduction de l'ensemble des accepteurs primaires Q. Ce temps est d'autant plus court que le nombre de photons atteignant, par unité de temps, les centres photochimiques, est grand; donc que le nombre de molécules antennes associées à chacun de ces centres est important. Le temps de demie montée (t 1/2) de la fluorescence variable donne donc une mesure relative du nombre moyen de chlorophylles associées aux centres photochimiques du PS II et par conséquent la taille de l'antenne.

La forme sigmoïde ou exponentielle de ces cinétiques a été interprétée (JOLIOT et JOLIOT, (53)) par la possibilité ou la non possibilité des transferts d'énergie entre les unités PS II. L'inflexion de la réponse sigmoïde est d'autant plus grande que les transferts d'énergie d'unité à unité sont aisés.

La surface hachurée (Fig. 7) comprise entre la courbe de montée de fluorescence et l'asymptote (état Q^-) est proportionnelle au nombre de centres PS II présents dans la cuve de mesure (FORBUSH et KOK (132)).

Les mesures sont faites, in vivo, pour la détermination des rapports FV/FT, des temps de demi montée et des concentrations relatives des centres PS II, et in vitro sur des suspensions de plastes isolés pour la détermination des valeurs absolues des intensités de fluorescence, ainsi que pour la détermination des nombres relatifs de centres (dans les conditions standards : 5 µg de chlorophylles dans la cuve de mesure). Dans tous les cas la cuve est cylindrique (3 mm de diamètre et 1 mm de hauteur), la lumière d'excitation parvenant perpendiculairement à la section circulaire afin de diminuer les phénomènes d'ombrage.

2.6.4. - Détermination des activités RuDP et PEP carboxylasiques

- RuDP carboxylase :

Les broyats cellulaires totaux sont cassés aux ultrasons, sous azote, et en présence de β - mercaptoéthanol afin d'empêcher les oxydations des phénols, durant 30 secondes sous 8 K cycles. Les techniques de détermination des deux activités enzymatiques sont celles publiées par SLACK et HATCH (113).

Le milieu réactionnel pour la détermination de l'activité RuDP carboxylasique contient : 23 µmoles de tampon tris-HCl, pH 8,3 ; 2,3 µmoles de β - mercaptoéthanol ; 2,3 µmoles de $MgCl_2$; 14,5 µmoles de $NaH^{14}CO_3$; 0,46 µmole de ribulose 1,5-ribulose diphosphate et du surnageant (27 000 g) de l'extrait végétal, pour un volume final de 0,3 ml (la concentration du matériel végétal étant ajustée de façon à ce que la vitesse d'incorporation soit constante sur 10 minutes à 30°C). Le milieu réactionnel était soumis à une préincubation de 10 minutes sans RuDP de façon à supprimer tout retard initial dans la vitesse de réaction). Les incorporations étaient mesurées sur 5 et 10 minutes.

- PEP carboxylase :

Le milieu réactionnel pour la détermination de l'activité PEP carboxylase contenait 18,75 µmoles de tampon tris-HCl, pH 8,3 ; 3,75 µmoles de β - mercaptoéthanol ; 1,87 µmoles de $MgCl_2$; 0,75 µmoles de phosphoénolpyruvate de sodium ; 1,87 µmoles de $NaH^{14}CO_3$ et de l'extrait tissulaire non centrifugé dans un volume total de 0,3 ml (en telle concentration que la vitesse d'incorporation soit constante durant au moins 5 minutes à 30°C). Les incorporations étaient mesurées après 2,5 et 5 minutes.

Les réactions sont dans les deux cas arrêtées par addition d'acide trichloracétique, des portions aliquotes séchées sur papier filtre ont été comptées directement dans du toluène fluoré (0,4 % PPO et 0,01 % POPOP). La radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation liquide Intertechnique SL 40. On a pu vérifier, grâce à cet appareil que l'extinction était comparable dans tous les échantillons. Les résultats ont été exprimés en micromoles de CO_2 fixées par minute et par mg de protéines solubles ou par mg de chlorophylles totales.

III. RESULTATS.

1. - RESULTATS PRELIMINAIRES

- D. LAVAL-MARTIN, Evolution des pigments et des plastes au cours de la maturation de L. esculentum, var. cerasiforme. Physiol. Vég., 15, 77-97, 1969.

Dans ce premier travail consacré à l'étude de la maturation de la Tomate cerise, nous avions démontré que le phénomène de maturation se caractérisait par une disparition selon une loi exponentielle des pigments chlorophylliens, contemporaine d'une biosynthèse importante de caroténoïdes.

Simultanément, les ultrastructures plastidiales évoluent depuis le chloroplaste à organisation granaire classique dans le fruit vert jusqu'au chromoplaste où régressent les structures lamellaires tandis que s'accumulent deux types d'inclusions caroténoïdes : gouttelettes liposolubles et cristaux en "baguettes".

Ces résultats nous permettaient d'affirmer que la maturation n'était pas une simple dégénérescence des chloroplastes mais qu'il s'agissait d'un phénomène dynamique éventuellement réversible, conséquence d'une biosynthèse préférentielle d'une certaine catégorie pigmentaire.

A l'appui de ces résultats, nous avons entrepris une étude plus détaillée sur la synthèse des pigments caroténoïdiens, ainsi qu'un examen, en cryodécapage, de la formation et de la morphologie exacte de ces accumulations intrachromoplastiques.

Nous avons, à partir de ce moment, toujours distingué les deux parties du péricarpe du fruit, "chair" et "pulpe", que nous avions vues évoluer différemment. Nous avons, de plus, complété l'étude de la maturation par celle de certains stades de la croissance du fruit.

2. - EVOLUTION PIGMEMTAIRE

- D. LAVAL-MARTIN, J. QUENNEMET & R. MONEGER, Pigment evolution in Lycopersicum esculentum fruits during growth and ripening. (Phytochem. 1975).

- D. LAVAL-MARTIN, J. QUENNEMET, et R. MONEGER, Sur l'évolution des caroténoïdes et des chlorophylles du fruit de tomate cerise pendant sa croissance et sa maturation. C. R. Acad. Sc. Paris, 274, 2879-2882, 1972.

L'évolution pigmentaire des deux parties du fruit, rappelée Fig. 8 , se déroule selon trois phases principales successives (MARKS et coll., (84)) :

- la phase de croissance qui se caractérise ici par un équipement pigmentaire de type foliaire,

- la phase de transition contemporaine d'une diminution des pigments totaux, surtout due à la disparition rapide des pigments chlorophylliens qui ne se résolvent pas (DURAND et LAVAL-MARTIN (25), en dérivés tétrapyrroliques, (CHICHESTER et NAKAYAMA, (14)). Durant cette période les deux régions du fruit ne s'enrichissent que très faiblement et uniquement en β - carotène,

- enfin, la phase de maturation qui fait apparaître des différences significatives dans l'évolution pigmentaire de la "pulpe" et celle de la "chair". Dans la "pulpe" le contenu pigmentaire total ne change que très peu, ce qui suggère qu'il pourrait y avoir réutilisation des groupes phytols provenant des chlorophylles pour les synthèses, en particulier de β - carotène (RAMIREZ et TOMES (102)) ; dans la "chair", le contenu pigmentaire se trouve multiplié par 4 à 5 par suite de l'accumulation de phytofluène et surtout de lycopène.

Cette dualité des évolutions pigmentaires dans les deux parties du fruit peut s'interpréter par un retard de l'évolution de la "pulpe" par rapport à celle de la "chair" ; retard apparaissant à partir du stade vert adulte. Dans ces conditions : les derniers stades envisagés pour la "pulpe" (e ou f) pourraient correspondre au stade de maturation moyenne pour la "chair" (c).

Il peut s'agir aussi d'une réelle différence entre les métabolismes pigmentaires des deux régions du fruit. L'accumulation du β - carotène dans la "pulpe" ne présente en effet aucun retard par rapport à celle dans la "chair". Au stade g, on trouve d'ailleurs une plus grande concentration de ce pigment dans la "pulpe" que dans la "chair" correspondante. De plus, dès le stade c, dans la "chair" qui commence tout juste à accumuler le lycopène, on peut doser du phytofluène, corps qui n'a jamais pu être

PHYTO 618 2029- H PHYTOCHEM

Phytochemistry, 1975, Vol. 14, pp. 000 000, Pergamon Press. Printed in England.

PIGMENT EVOLUTION IN *LYCOPERSICON ESCULENTUM* FRUITS DURING GROWTH AND RIPENING

DANIELLE LAVAL-MARTIN*

Laboratoire de P.O.V.A.R., CNRS, 4 ter, route des Gardes, 92190, Meudon, France

and

JOÈLLE QUENNEMET and RENÉ MONÉGER

Laboratoire de Régulations métaboliques et différenciation des plastes, Université P. et M. Curie, Torr 53, 2 étage, 4 Place Jussieu, 75230, Paris, Cedex 05, France

(*Revised Received* 5 *February* 1975)

Key Word Index – *Lycopersicon esculentum*; Solanaceae; tomato fruit; maturation; plastids; carotenoids; chlorophylls.

Abstract—During growth and subsequent maturation, the distribution and formation of pigments in the inner pulp and in the outer region of the pericarp of 'cherry' tomatoes is different. The foliar pigments (*β*-carotene, lutein, violaxanthin, auroxanthin, neoxanthin, chlorophylls *a* and *b*) accumulate in both parts of the growing fruit, then remain fairly constant, except for the chlorophylls and neoxanthin which decrease. Phytofluene and lycopene appear only at the end of ripening and almost exclusively in the external part of the fruit; lycophyll and lycoxanthin can be detected during the entire growth and maturation period. The results suggest that development involves three distinct steps and show that the growth period is separated from that of maturation by a lag phase, during which new regulatory phenomena occur and induce pigment transformations which lead to complete maturity.

INTRODUCTION

The study of carotenoid biosynthesis and control mechanisms in flowers [1,2] and fruits [3–7] is well documented. Although the ripening tomato fruit has often been the material of choice in these studies [8–17], no apparent effort has been made to separate the two physically distinct regions of the pericarp: the inner jelly-like portion containing the seeds and the outer portion of firm consistency. Several recent publications have dealt with pigment evolution and ultrastructure in ripening tomatoes [18–21], but again the pericarp was not separated.

In a previous study, we presented evidence of a morphological difference between the chromoplasts of the two regions of cherry tomato pericarp here called the inner "pulp" and outer "flesh". The present studies were undertaken to examine the possible differences in pigment composition and evolution in these two regions of the growing and ripening fruit. The results presented complement previous data on the relationship between pigment content and ultrastructure of plastids [22, 23].

RESULTS

Pigment distribution between the "pulp" and "flesh" in normal and high temperature-ripened fruits

Based on the analyses of pigment content of leaves and of the two regions of the fruit (Table 1) we can distinguish three categories of pigments. (i) Exclusively foliar pigments: we have never detected flavoxanthin in tomato fruits at any stage of development. (ii) Common pigments:

* Present address: Laboratoire de Cytophysiologie de la Photosynthèse, CNRS, 91190, Gif-sur-Yvette, France.

Table 1. Pigment composition of the inner "pulp" and outer "flesh" of "cherry"

	Phytofluene		Lycophyll and Lycoxanthin		Lycopene		β-Carotene		Lutein		Epoxylutein	
"Pulp"	*	†	*	†	*	†	*	†	*	†	*	†
6‡	0	0	4	0·3	0	0	78	5·5	70	4·9	0	0
8	0	0	4·5	0·2	0	0	67	3·5	132	7	0	0
10	0	0	2·5	0·2	0	0	91	6	126	8·3	0	0
12 or a	0	0	6	0·5	0	0	92	7·9	53	4·6	0	0
b	0	0	6·5	0·7	0	0	114	13·3	46	5·4	0	0
c	0	0	7·5	1·2	4	0·6	119	19	49	7·8	0	0
d	0	0	9·5	1·9	14	2·9	117	24	34	7	0	0
e	0	0	25	5·2	36	7·4	136	28	46	9·5	0	0
f	0	0	21	4·4	107	22·3	190	39·7	36	7·5	0	0
g	0	0	25	4·4	233	40·9	236	41·4	43	7·5	0	0
30 C	0	0	0	0	0	0	140	48·3	107	36·9	13	4·5
"Flesh"												
6‡	0	0	3	0·2	0	0	67	3·6	84	4·5	0	0
8	0	0	6	0·4	0	0	100	7·6	130	10	0	0
10	0	0	5	0·3	0	0	100	6·7	125	8·4	0	0
12 or a	0	0	9	0·9	0	0	91	8·8	64	6·2	0	
b	0	0	8·5	1·1	0	0	84	10·8	78	10	0	0
c	14	2·3	13	2·2	32	5·4	123	20·6	64	10·7	0	0
d	74	9·4	21	2·7	244	31	164	20·8	47	6	0	0
e	129	10·7	21	1·6	820	64·5	187	14·7	32	2·5	0	0
f	131	8·4	21	1·3	1220	77·8	120	7·6	40	2·6	0	0
g	219	7·2	30	1	2530	82·9	209	6·8	33	1·1	0	0
30 C§	0	0	0	0	112	32	158	45·1	44	12·6	16	4·6
"Leaves"	0	0	0	0	0	0	760	5·3	705	4·9	0	0

For each fruit determination 40–50 fruits were harvested, mechanically separated into "pulp" and "flesh" and subjected to pigment analysis as described in methods. Analyses of fruits matured at 30° were performed when the fruits exhibited no further colour changes. Adult specimens were used for pigment analyses of leaves.

chlorophylls *a* and *b* were found in all tissues grown at normal temperature, even in fruits at the terminal stage of ripening, as were β-carotene, lutein and violaxanthin. Neoxanthin was found in leaves and in young fruits. (iii) Non-foliar pigments, identified in one or both regions of the fruit: phytofluene was found only in the "flesh", while lycopene was detected in both regions of the ripening fruit. Lycophyll and lycoxanthin, previously identified only occasionally [1,24], were detected in both regions of normally ripened fruits. Neither α-, ξ- or γ-carotene [25] nor δ-carotene [26], previously reported in some varieties of tomato were not detected. Although δ-carotene is considered the immediate precursor of β-carotene, its apparent absence does not necessarily imply another biosynthetic pathway for β-carotene, but perhaps an extremely small free pool of the precursor.

Excised fruits at the fully green stage and ripened at 30° exhibit particular pigment distribution at the fully mature stage. Lutein and β-carotene, and the violoxanthin + auroxanthin fraction were present at about the same levels as those in normally matured fruits. Lycophyll + lycoxanthin, and phytofluene were not detected, and chlorophyll is undetectable in the "flesh". Lycopene is present only in the "flesh" and in reduced quantities, consistent with previous reports of high temperature inhibition of lycopene synthesis [19].

Neoxanthin, not found in normal mature fruits, apparently persists and epoxylutein, a pigment not normally found in any tomato tissue we examined, is present in both regions of high temperature-ripened fruits. This suggests that at 30° the tissues exist in a more oxidized state [27] and these results are similar to those obtained with the avocado fruit [28].

Quantitative evolution of pigments

Table 1 allows the distinction of two groups of pigments according to their maximum accumulation in the fruit. Major pigments (> 100 nmol g

tomato fruits during growth and subsequent ripening, and of adult leaves

Violaxanthin		Violaxanthin and Auroxanthin		Flavoxanthin		Neoxanthin		Chlorophyll *a*		Chlorophyll *b*		Total pigments	
*	†	*	†	*	†	*	†	*	†	*	†	*	†
21	1·5			0	0	6	0·4	880	62·2	355	25·1	1414	99·9
53	2·8			0	0	16	0·8	1455	77·1	160	8·5	1887	99·9
		64	4·2	0	0	36	2·3	855	56·4	340	22·4	1514	99·8
		15	1·3	0	0	4	0·3	668	57·5	324	27·9	1162	100
		35	4·1	0	0	0	0	448	52·4	206	24·1	855	100
		31	5	0	0	0	0	291	46·7	122	19·6	623	99·9
		31	6·3	0	0	0	0	206	42·3	76	15·6	487	100
		45	9·3	0	0	0	0	144	29·7	53	10·9	485	100
		44	9·2	0	0	0	0	65	13·6	16	3·3	479	100
		33	5·8	0	0	0	0	traces	0	traces	0	570	100
		21	7·2	0	0	9	3·1	traces	0	traces	0	290	100
25	1·3			0	0	6	0·3	1455	77·4	239	12·7	1879	100
47	3·6			0	0	21	1·6	723	55·3	280	21·4	1307	99·9
		73	4·9	0	0	27	1·8	845	56·7	316	21·2	1491	100
		45	4·4	0	0	7	0·7	576	56	296	22·9	1028	99·9
		67	8·6	0	0	0	0	374	48·1	166	21·4	777	100
		48	8	0	0	0	0	215	36·1	87	14·6	596	99·9
		31	3·9	0	0	0	0	151	19·2	55	7·0	787	100
		16	1·2	0	0	0	0	49	3·8	18	1·4	1272	99·8
		31	2	0	0	0	0	3	0·2	1	0	1567	99·9
		29	0·9	0	0	0	0	traces	0	traces	0	3021	99·9
		15	4·3	0	0	5	1·4	0	0	0	0	350	100
90	0·6	0	0	30	0·2	44	0·8	11109	61·8	5587	26·8	19917	99·9

* nmol g dry wt. † percentage of total pigment. ‡ Numbers are the dia (mm) of green growing fruits, the letters refer to stages of maturation: a: green fruit, 12 mm dia; b: yellow-green; c: yellow-pink; d: orange; e: pale red; f: red; g: deep red; § Fruits ripened at 30° were excised at the 12 mm dia stage.

dry wt) include chlorophylls *a* and *b* and lycopene, whose minima approach or are equal to zero, and *β*-carotene and lutein, which exhibit less profound fluctuations. Minor pigments (<100 nmol g dry wt) include violoxanthin, auroxanthin, neoxanthin, lycophyll and lycoxanthin. Neoxanthin is the only minor pigment not detectable at certain stages of the life of the fruit. It is interesting to note that, with the exception of the non-foliar lycophyll + lycoxanthin fraction, the qualitative and quantitative pigment content of young green fruits closely resembles that of the leaf.

β-Carotene accumulates in both regions throughout the life of the fruit, its rate of accumulation being accelerated at the terminal stages of ripening. In both regions of the fruit lutein attains an early maximum and then declines to about half its initial level by the end of maturation. Phytofluene and lycopene both appear at the yellow-pink stage (c) although the former is restricted to the "flesh". In this same region chlorophyll *a* decreases regularly during fruit evolution whereas a definite peak is noted in the "pulp". Chlorophyll *b* accumulation in the "flesh" reaches a peak toward the end of fruit growth while it apparently undergoes greater fluctuations in the "pulp".

The evolution of minor pigments is similar in both regions of the fruit. Pure violoxanthin is found only until the 8 mm dia stage and is thereafter found in the violoxanthin + auroxanthin fraction (see Experimental). Although their individual evolutions were not evaluated, the mixture evolves in the same manner in both regions of the fruit.

The fruit as a biological unit

The results presented in Table 1 are expressed on a dry wt basis in order to facilitate comparison with other published data. It was of interest to monitor the evolution of fr. and dry wt in the maturing fruits and the following results were obtained. In the outer "flesh" both fr. and dry wt evolve in parallel, the most active period of increase being between the yellow-green (b) and

orange (d) stages. At the end of maturation the dry wt of the "flesh" is *ca* twice that at the onset of ripening, indicating that *de novo* syntheses occur or that material is translocated from other parts of the plant. In the inner "pulp", changes in dry wt are more important than those in fr. wt. These data on dry wt changes are in opposition to other published data [29] but this may be due to a species difference.

DISCUSSION

Our data on pigment content of the two regions of the pericarp during growth and maturation of cherry tomatoes [22] (Table 1) show that the "pulp" and "flesh" undergo different patterns of pigment biogenesis. This is consistent with the dimorphism of chromoplasts observed in these two zones [23]. We believe the analytical data of Table 1 are rendered more physiologically meaningful by extrapolation to the mean fruit as biological reference unit since changes in absolute pigment content could be masked by concomitant changes in dry wt. Thus, it is possible to separate the life of the fruit into three distinct phases namely, growth, transition and maturation.

In the young fruit the pigments are of the foliar type, as observed in other species [28–30], with minor differences. Fruits at this stage are slightly richer in hydroxylated alicyclic carotenoids (neoxanthin, violoxanthin, lutein) and already contain some lycophyll and lycoxanthin, exclusively non-foliar pigments. The growth of the young fruit (6 mm dia) to the fully green (stage a) is accompanied by a 10-fold enrichment in pigments in both regions of the pericarp. There are kinetic differences in chlorophyll accumulation which might be related to differences in photosynthetic capacity of these tissues, but in general, pigment distribution in the two zones during growth is similar.

The transition period, which we define as between the fully green and yellow pink stages (a–c), involves important pigment modifications in both regions of the fruit. It is during this period that the chlorophyll–carotenoid ratio declines from five to about one, accompanied by a disorganization of the granal system [23] as previously observed [31–33].

The transition period in the tomato fruit is comparable to leaf senescence [5] where the disappearance of chlorophyll is accompanied by a lowered carotenoid content compared to green leaves. The photodestruction of chlorophyll would be favored by a lowered carotenoid production [15], especially xanthophylls as recently found [34], and is associated with a morphological disorganization of the chloroplasts. The relation between the pigment composition (chlorophylls–carotenoids ratio, membranal association between chlorophylls and β-carotene) [35–37] and chloroplast structure [38] (photosynthetic membrane integrity) is probably one of the most affected factors, during the transition period.

During transition, total pigment per fruit declines in both regions, largely as a result of the disappearance of chlorophylls *a* and *b*, as observed in other systems [39]. During this period there is only a slight accumulation of β-carotene, suggesting that if phytol groups resulting from chlorophyll degradation are eventually used for carotenoid biosynthesis [12], there would exist during transition a substantial free pool of phytol awaiting subsequent re-utilization.

During the maturation phase of the fruit the total pigment content does not appreciably change in the "pulp", consistent with the possible reutilization of phytol [22] already discussed and relatively little new material accumulates. In the "flesh", however, the *ca* 4-fold increase in carotenoid content, represented largely by lycopene in typical tomato chromoplasts [18–21,23,31–33] implies a significant formation of new material. During maturation β-carotene and lycopene accumulate in the fruit, consistent with the latter being the precursor of the former [8–9,40–41]. On the other hand, we find no lycopene in fruits ripened at 30° or in leaves whereas significant β-carotene is present in these tissues. This suggests another route for β-carotene synthesis [11,42–43] as does the different ratio of lycopene β-carotene in the two regions of the fruit. Small pools of lycopene undergoing rapid turnover cannot be excluded.

In the apparent absence of chlorophyll (and presumably phytol) synthesis during maturation it is conceivable that geranyl-geranyl-PP could be diverted towards carotenoid biosynthesis [1,44]. In this context it is interesting to note that in

certain systems the inhibition of chlorophyll accumulation is associated with an accumulation of lycopene in typical chromoplast structures, even in tissues not normally containing this carotenoid [45]. In our material we cannot eliminate, however, the possibility that phytol is still produced during maturation and is transformed into carotenoids, as demonstrated in other systems [12].

We have demonstrated that pigment metabolism during ripening of cherry tomato fruits is qualitatively and quantitatively different in the two regions of the pericarp. The inner "pulp" is relatively inactive and whether this difference is caused by genetic or environmental factors, or both, we conclude that a definite compartmentalization exists. These metabolic differences are deranged in fruits excised at the fully green stage and ripened at 30°, the pigment content of the two regions generally resembling either young fruits or mature "pulp". Thus, pigment evolution characteristic of the "flesh", especially lycopene formation, is highly temperature sensitive. Clearly pigment formation in this material is under genetic control, as demonstrated in other systems [46-48] and the consequent enzymatic steps [17,41,49] are expected to be temperature sensitive [19,27,50]. We cannot say if alterations in pigment metabolism at 30° are due to changes at the transcriptional or translational level, or at the level of individual enzyme activity. Changes in the permeability of the plastid envelope [40-42], especially toward mevalonate cannot be excluded.

EXPERIMENTAL

Lycopersicum esculentum var. *cerasiforme* (DUN) A. Gray were grown under natural conditions. Fruits were classified by size during growth (6-12 mm dia) and by color during maturation, as previously described [21]. For each determination 40-50 fruits were harvested and divided into the external region of the pericarp (called the "flesh" and having a rather firm consistency) and the fluidic internal portion (called the "pulp" and including the seeds). The separated materials were immediately frozen in liquid N_2, lyophilized and stored *in vacuo* in darkness before analysis.

Pigment extraction and separation. Lyophilized material was powdered in a ball grinder in the presence of $CaCO_3$ and liquid N_2. All subsequent operations were performed at ≤4°. Pigments were extracted with Me_2CO-H_2O (9:1) and an aliquot of this extract, corresponding to 250 mg of dried tissue, was saponified, washed, evaporated and finally dissolved in petrol (40-60°) containing 2% Me_2CO. In the case of dark red fruits the "flesh" still contained pigments after the first extraction. The product of a second extraction with hexane yielded only one chromatographic fraction (see below) with an absorption spectrum of lycopene.

A preliminary separation of carotenoids was obtained by ascending chromatography on a cellulose powder column [51]. Pigments were eluted with a gradient of Me_2CO (2-10%) in petrol. The first fraction eluted contained a mixture of carotenoids which was further fractionated with the same solvent system by descending chromatography on $Ca(OH)_2$ in a stainless steel column operating under a N_2 pres. of 3 kg cm^{-2}.

Identification of pigments. Chlorophyll *a* and *b* content in the original Me_2CO-H_2O extract was determined by controlled conversion to pheophytin products [52, 53]. Carotenoids and their derivatives were identified and estimated by conventional methods [54, 55]. The different fractions obtained by the above methods were estimated by reference to the main component. When auroxanthin, which elutes with violoxanthin, was present, the two carotenoids were estimated together as violaxanthin. Since lycoxanthin was always present in the lycophyll fraction, these two carotenoids were also estimated together as lycophyll. Chlorophyll and carotenoid determinations were reproducible to within ±3% [56]. Pigments extracted from lots of five tomatoes showed a variability of ±2·5% for green fruits and ±24% for mature specimens [57]. We minimized this apparent heterogeneity by sampling 40-50 fruits, corresponding to 10 g dry wt, for each determination which only required 250 mg of material.

Acknowledgements We wish to express our deepest thanks to Professor Lefort-Tran and to Professor Ulrich who suggested this collaboration, to Miss J. Rateau for her technical assistance and to Dr. J. Diamond for his help in the preparation of the final manuscript.

REFERENCES

1. Costes, C. (1965) Thèse Doctorat d'Etat Sc. Nat. Paris.
2. Valadon, L. R. G. and Mummery, R. S. (1968) *Ann. Botan.* **31**, 497.
3. Moneger, R. (1956) *Des Physiol. Vég. Paris.*
4. Audigie, C. (1958) *Rev. Gen. Botan.* **65**, 581.
5. Mac Kinney, G. (1961) Univ. Calif. Printing Depart. Berkeley, **302**.
6. Workman, M. (1963) *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* **38**, 149.
7. Davies, J. N., Matthews, S. and Kirk, J. T. O. (1970) *Phytochemistry* **9**, 797.
8. Porter, W. J., Lincoln, R. E. (1950) *Arch. Biochem.* **27**, 390.
9. Tomes, M. L., Quackenbush, L. W. and Kargl, T. E. (1956) *Botany Gaz.* **117**, 248.
10. Porter, J. W. and Anderson, D. G. (1967) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **18**, 197.
11. Tomes, M. L. (1963) *Botany Gaz.* **124**, 180.
12. Ramirez, D. A., Tomes, M. L. (1964) *Botany Gaz.* **125**, 221.
13. Raymundo, L. C., Griffiths, A. E. and Simpson, K. L. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1239.
14. Simpson, D. J., Chichester, C. O. and Lee, T. H. (1974) *Aust. J. Plant Physiol.* **1**, 119.
15. Burns, E. R., Buchanan, G. A. and Carter, M. C. (1971) *Plant Physiol.* **47**, 144.
16. Yokoyama, H. and De Benedict, C. (1972) *Phytochemistry* **11**, 1721.
17. Hsu, W. J., Yokoyama, H. and Coggins, C. W. Jr. (1972) *Phytochemistry* **11**, 2985.
18. Kudairi, A. K. (1972) *Im. Scientist* **60**, 696.
19. Ben-Shaul, Y. and Naftali, Y. (1969) *Protoplasma* **67**, 333.

20. Harris, W. M. and Spurr, A. R. (1969) *Am. J. Botany* **56**, 369.
21. Laval-Martin, D. (1969) *Bull. Soc. Franc. Physiol. Vég.* **15**, 77.
22. Laval-Martin, D., Quennemet, J. and Moneger, R. (1972) *C.R. Acad. Sci. Paris* **274**, 2879.
23. Laval-Martin, D. (1974) *Protoplasma* **82**, 33.
24. Ben Aziz, A., Britton, G. and Goodwin, T. W. (1973) *Phytochemistry* **12**, 2759.
25. Meredith, F. I. and Purcell, A. E. (1966) *Am. Soc. Hort. Sci.* **89**, 544.
26. Tomes, M. L. (1969) *Genetics* **62**, 769.
27. Laval-Martin, D., Quennemet, J. and Moneger, R. (1974) *Coll. Int. C.N.R.S. no* 238 *Paris*.
28. Gross, J., Gabai, M. and Lifshitz, A. (1973) *Phytochemistry* **12**, 2259.
29. Ming Ho, Y., Olson, L. E. and Salunke, D. K. (1967) *Phytochemistry* **6**, 1457.
30. Valadon, L. R. C. and Mummery, R. S. (1972) *Ann. Botany* **36**, 471.
31. Rosso, S. W. (1967) *J. Ultrastr. Res.* **20**, 179.
32. Harris, W. M. and Spurr, A. R. (1969) *Am. J. Botany* **56**, 369.
33. Harris, W. M. and Spurr, A. R. (1969) *Am. J. Botany* **56**, 380.
34. Rabinowitch, H. D., Budowski, P. and Kedar, N. (1975) *Planta* **122**, 91.
35. Boardman, N. K. and Anderson, J. M. (1967) *Biochem. Biophys. Acta* **143**, 187.
36. Ogawa, T., Kanai, R. and Shibata, K. (1968) *Comparative Biochem.* and *Biophys.* of *Photosynthesis*, p. 22, Univ. of Tokyo Press.
37. Tae, J. I., Hess, J. L. and Benson, A. A. (1968) *Comparative Biochem.* and *Biophys.* of *Photosynthesis*, p. 36, Univ. of Tokyo Press.
38. Faludi-Daniel, A., Fridvalsky, I. and Gyurdjan, I. (1968) *Planta* **78**, 184.
39. Eilati, S. K., Monselise, S. P. and Budowski, P. (1969) *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **94**, 346.
40. Hill, H. M., Shah, S. P. J. and Rogers, L. J. (1970) *Phytochemistry* **9**, 749.
41. Batra, P. P., Gleason, R. M. and Louda, J. W., J. R. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1309.
42. Goodwin, T. W. and Jamikorn, M. (1952) *Nature* **70**, 104.
43. Hill, H. M., Calderwood, S. K. and Rogers, L. J. (1971) *Phytochemistry* **10**, 2051.
44. Trudel, M. J. and Ozbun, J. L. (1970) *J. Exp. Botany* **21**, 881.
45. Fortino, J. and Splittstoesser, W. E. (1974) *Plant Cell Physiol.* **15**, 59.
46. Sink, H. C., Herner, R. C. and Knowlton, L. L. (1974) *Can. J. Botany* **52**, 1657.
47. Monselise, S. P. and Halevy, A. H. (1961) *Science* **133**, 1478.
48. Lincoln, R. A. and Porter, J. W. (1950) *Genetics* **35**, 206.
49. Papastephanou, C., Barnes, F. J., Briedis, A. V. and Porter, J. W. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* **157**, 415.
50. Kirk, J. T. O. and Tilney-Bassett, R. A. E. (1967) *The Plastids, Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*. Freeman, London.
51. Moneger, R. (1968) *Physiol. Vég.* **6**, 367.
52. Delaporte, N. and Laval-Martin, D. (1971) *Anal. Chim. Acta* **55**, 415.
53. Delaporte, N. and Laval-Martin, D. (1971) *Anal. Chim. Acta* **55**, 425.
54. Foppen, F. M. (1971) *Chromatographic Rev.* **14**, 133.
55. Hager, A. and Meyer-Bertenrath, T. (1967) *Planta* **76**, 149.
56. Michanol, Y. (1970) *DES Sc. Nat. Paris*.
57. Quennemet, J. (1970) *DEA Physiol. Vég. Paris*.

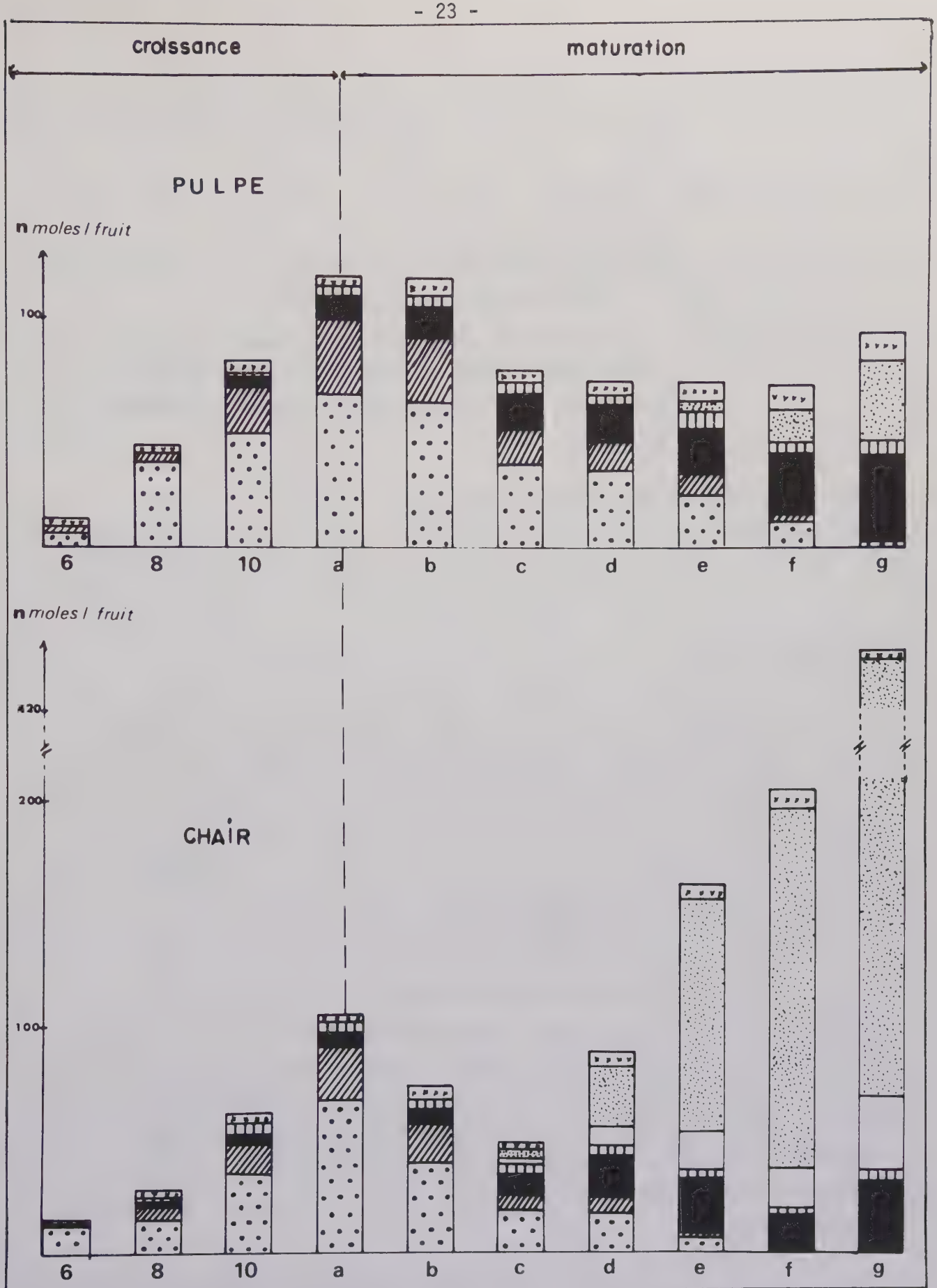


Figure 8 - Variations des contenus pigmentaires de la "pulpe" et de la "chair" des Tomates "cerise" durant leur croissance et leur maturation.

Chlorophylle a — β-Carotène — Lutéine — Violaxanthine, auroxanthine, lycophylle, lycoxanthine et néoxanthine

Chlorophylle b — Phytofluène — Lycopène

détecté dans la "pulpe", même lorsque ce dernier tissu contenait une quantité appréciable de lycopène.

3. - EVOLUTION DES STRUCTURES

3.1 - Mise en évidence, par cryodécapage, de l'évolution des chloroplastes en deux types de chromoplastes chez le fruit mur.

- D. LAVAL-MARTIN, La maturation du fruit de tomate cerise : mise en évidence par cryodécapage de l'évolution des chloroplastes en deux types de chromoplastes. Protoplasma, 82, 33-59, 1974.

3.2 - Expérience de maturation à 30°C

- D. LAVAL-MARTIN, Remarques sur l'évolution lipochromique et ultrastructurale des plastes durant la maturation du fruit de tomate cerise. Communication au Colloque n° 238, CNRS, 1974.

3.3 - Conclusions

Les études précédentes ont montré l'existence, dans les deux régions du fruit mûr, d'une dualité structurale des chromoplastes. Dans la zone interne du fruit ou "pulpe", apparaissent des structures globulaires qui ne sont autres que des formes d'accumulation du β - carotène, elles semblent dériver de la dilatation de certains thylacoïdes granaires dont la désorganisation amorcée pendant la phase de transition se poursuit. En fin de maturation, ces globules très nombreux, gorgent le stroma du plaste qui prend alors une forme sphérique.

On observe dans la zone externe du fruit ("chair"), outre ces globules, d'importantes structures pseudocristallines qui semblent avoir pris naissance à l'intérieur des lumens de grands thylacoïdes. Ces inclusions qui correspondent à la forme d'accumulation du lycopène, peuvent s'étendre dans le stroma du plaste, ou former une sorte de carapace sous la double membrane. Les chromoplastes présentent alors en fin de maturation, des formes très allongées et une rigidité qui les rend fragiles lors des fractionnements.

La corrélation entre la nature de l'accumulation pigmentaire et son organisation structurale à l'intérieur du chromoplaste a été précisée

Protoplasma 82, 33—59 (1974)
© by Springer-Verlag 1974

La maturation du fruit de tomate cerise: Mise en évidence, par cryodécapage, de l'évolution des chloroplastes en deux types de chromoplastes[1]

Danielle Laval-Martin

Laboratoire de Cytophysiologie de la Photosynthèse, C. N. R. S., Gif sur Yvette, France

Avec 39 Figures

Reçu le 4 Février 1974

Summary

The Maturation of the Cherry Tomato Fruit: Evidence, by Freeze-Etched Studies, of the Evolution of Chloroplasts in Two Classes of Chromoplasts

During the maturation of the fruit of "cherry" tomato, the chloroplasts evolve into two different kinds of chromoplasts. One of them, located in the jelly part of the pericarp, contains only globular inclusions of β-carotene. On the other hand, the outer part of the fruit contains chromoplasts which possess, in addition of such globules, voluminous sheets of lycopene, easily cleaved by freeze-etching. These types of inclusions both occur in the lumens of chloroplast thylakoids which have already lost their chlorophylls.

Résumé

Durant la maturation du fruit de tomate « cerise », les chloroplastes évoluent en deux types de chromoplastes. Les uns, localisés exclusivement dans la partie gélifiée du péricarpe, ne contiennent que des inclusions globoïdes à β-carotène. Les autres, situés dans la partie externe du fruit, possèdent, outre ces globules pigmentaires, de volumineuses plaques cristallines de lycopène, aisément clivables par cryodécapage. Ces deux types d'inclusions prennent naissance à l'intérieur des lumens d'ex-thylacoides chloroplastiques, qui ont en un premier temps perdu leurs pigments chlorophylliens.

1. Introduction

Dés 1883 Meyer et Schimper distinguaient les « Chlorophyllkörner » des « Farbkörper ». Il a cependant fallu attendre la microscopie électronique pour que soit précisée la structure granulaire des chloroplastes (Heitz 1936, Frey-Wyssling et Mühlethaler 1949) ; puis que soit décrite (Frey-Wyss-

[1] Cet article constituera un chapitre de notre mémoire de Thèse d'État.

LING et KREUTZER 1958 a, 1958 b, BUVAT 1958 et LANCE 1958), l'infrastructure des chromoplastes.

De vives controverses se sont élevées au sujet de l'ontogénèse de ces organites cellulaires. Tandis qu'une école (FREY-WYSSLING et KREUTZER 1958 a, 1958 b, FREY-WYSSLING et SCHWEGLER 1965) n'admettait la génèse de chromoplastes qu'à partir de leucoplastes spécialisés ; d'autres auteurs (STEFFEN et WALTER 1958, LANCE-NOUGARÈDE 1960 et GEROLA 1960 a, 1960 b, 1960 c) estimaient qu'il existait une filiation continue entre proplaste, chloroplaste et chromoplaste, rejoignant les idées d'un précurseur SAVELLI (1937) qui avait mentionné l'existence d'organites intermédiaires et les avait d'ailleurs nommés : « chloro-chromoplastes ».

Diverses études ont permis de distinguer différents types de chromoplastes. Ceux qui accumulent presque exclusivement les pigments caroténoïdiens sous forme de globules comme dans la fleur de renoncule (FREY-WYSSLING et KREUTZER 1958 a), dans celle de chrysanthème (LANCE-NOUGARÈDE 1960) ou de *Davidia* (SCHURMANN et VILLIGER 1967), ou encore dans le périgone de la fleur de tulipe (LICHTENTHALER 1970), ainsi que dans la feuille automnale de *Ginkgo biloba* (TOYAMA 1967 a) ou dans l'orange Valencia (THOMSON 1966). D'autre part ceux qui, comme dans la racine de carotte (STRAUS 1953, 1956, STEFFEN et RECK 1964, BEN-SHAUL et KLEIN 1965, FREY-WYSSLING et SCHWEGLER 1965, TOYAMA 1967 a, 1967 b, BEN-SHAUL, TREFFRY et KLEIN 1968), dans le fruit de tomate (ROSSO 1967 et 1968, BEN-SHAUL et NAFTALI 1969, HARRIS et SPURR 1969 a, 1969 b) et la corolle de narcisse (FREY-WYSSLING 1967, KUHN 1970) présentent des cristaux. Enfin dans certains fruits comme le *Capsicum annuum*, les auteurs ont pu distinguer un troisième type caractérisé par de nombreux filaments lipoprotéiniques (FREY-WYSSLING et KREUTZER 1958 b, STEFFEN 1958, SPURR et HARRIS 1968, 1970).

Depuis 1965 des travaux sont consacrés à l'étude de ces organites chez la tomate. Certains s'attachent à préciser les détails de l'ultrastructure des étapes de formation des chromoplastes dans le péricarpe du fruit (GRILLI 1965, ROSSO 1967, 1968); d'autres s'efforcent, par des dosages pigmentaires parallèles, de relier les structures à l'apparition de nouvelles catégories de pigments

---

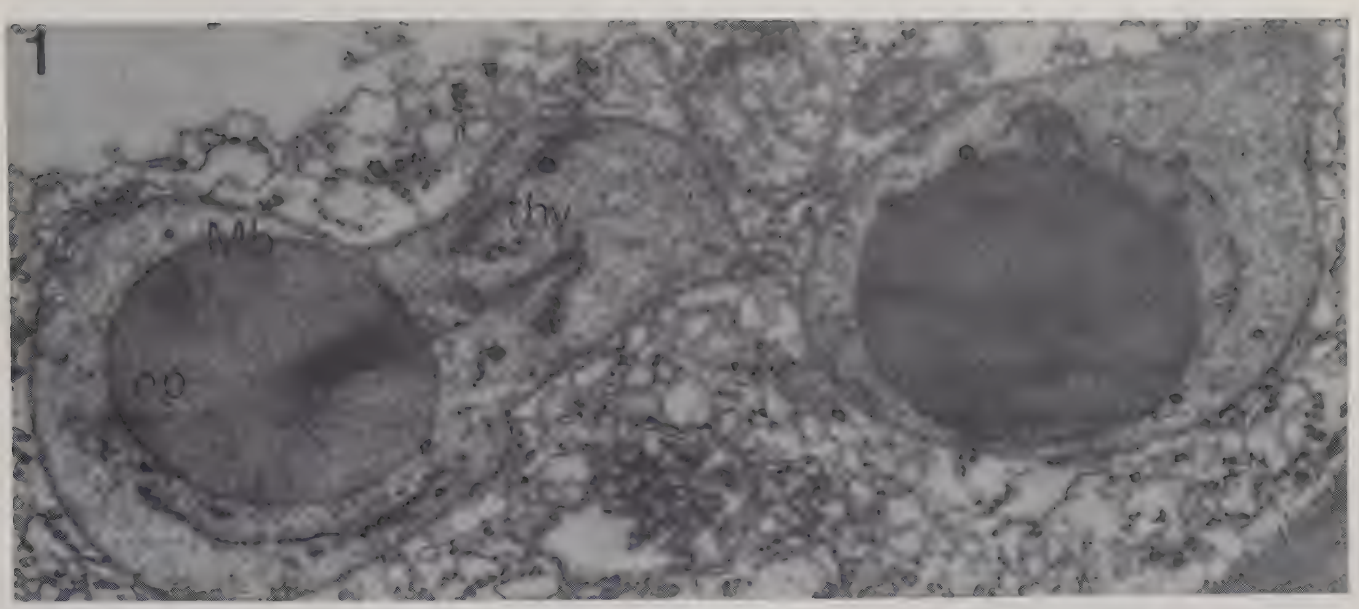
Fig. 1. Proplaste de la « chair » d'un fruit de 6 mm de diamètre. Enclaves protéiques (*ep*) limitées par une membrane (*Mb*) ; thylacoides indépendants (*thy*). ×20 300

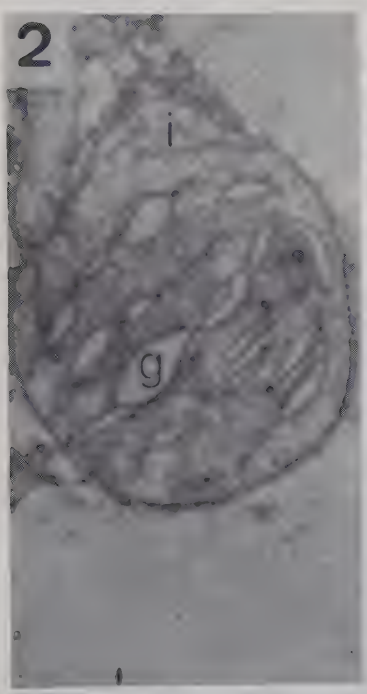
Fig. 2. Plaste de la « chair » d'un fruit de 8 mm de diamètre. Les thylacoides s'apparient en ébauches d'empilement granaire (*g*). ×13 600

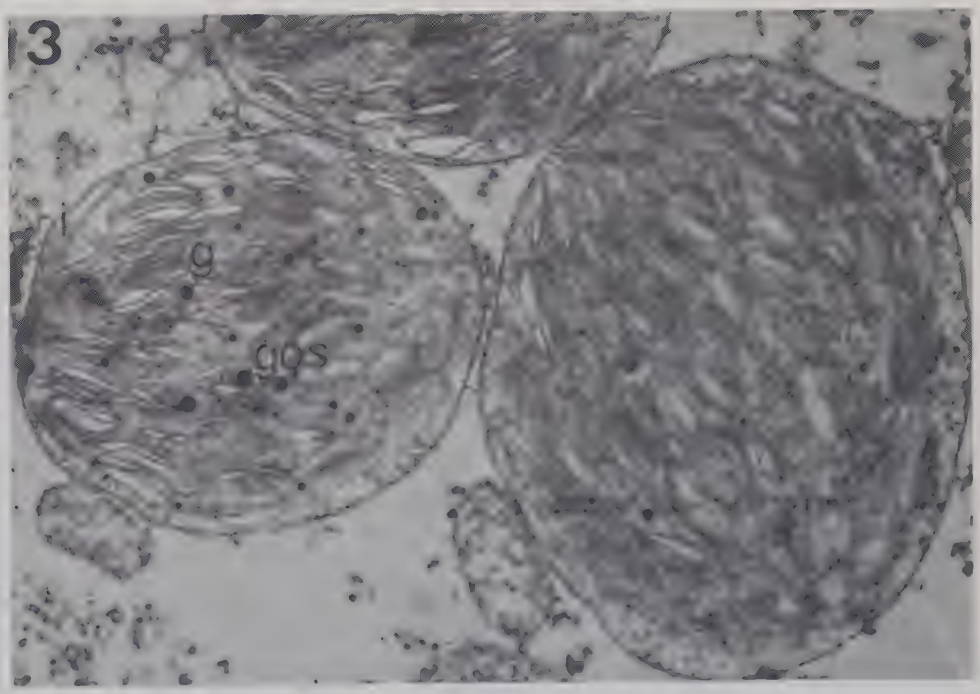
Fig. 3. Chloroplaste de la « chair » d'un fruit de 11 mm de diamètre. Les grana (*g*) et les globules osmiophiles (*gos*) sont nombreux. ×10 100

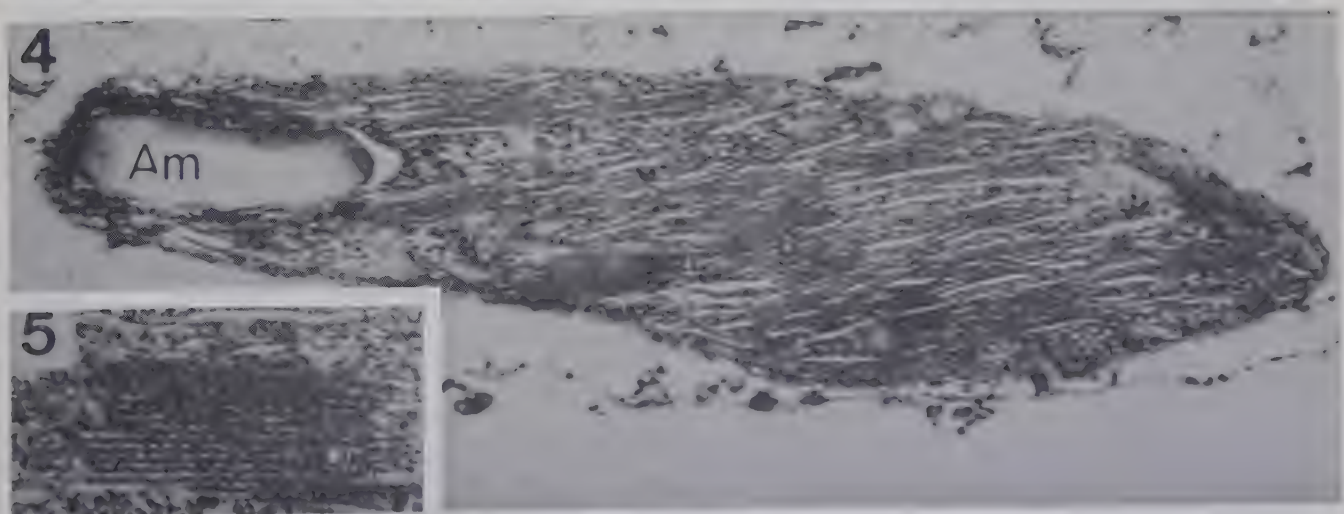
Fig. 4. Jeune chloroplaste de la « pulpe » d'un fruit de 6 mm de diamètre. Il contient des grana (g) et de l'amidon (*Am*). ×22 000

Fig. 5. Granum bien différencié d'un chloroplaste de la « pulpe » d'un fruit en croissance, de 6 mm de diamètre, avec des zones de partition. ×60 000


1
Mb
thy
co


2
i
g


3
i
g
gos


4
Am

5

(Harris 1968, 1970, Harris et Spurr 1969 a, Laval-Martin 1969). Enfin, par modification de la température de maturation, Ben-Shaul et Naftali (1969), ont établi une corrélation entre la présence d'un type particulier d'inclusions et celle d'un pigment ; le lycopène.

Sur *Lycopersicon esculentum* var. Dun. A. Gray, nous avons antérieurement montré, qu'au cours de la maturation, la transformation des chloroplastes en chromoplastes semble se faire en deux étapes. Au cours de la première, l'arrêt de la synthèse des pigments chlorophylliens entraîne la désorganisation de la structure granaire du chloroplaste tandis qu'au cours de la seconde phase, caractérisée par une synthèse accélérée des pigments caroténoïdes, les chromoplastes accumulent à la fois des inclusions globulaires et d'autres en forme de baguettes (Laval-Martin 1969).

Puis dans une étude biochimique (Laval-Martin, Quennemet et Monéger 1972) sur l'évolution pigmentaire différentielle de la région interne du fruit ou « pulpe » et de la région externe ou « chair », nous avons pu montrer que si ces deux régions possèdent, en fin de maturation du fruit, des teneurs tout à fait comparables en β-carotène, la partie externe est dix fois plus riche en lycopène que la partie interne.

Il semble donc que ce matériel constitue un modèle favorable pour la recherche des relations entre la forme structurale des inclusions caroténoïdiennes, leur nature biochimique et leur mode de dèpot à l'intèrieur des plastes. Nous avons dès lors poursuivi l'étude de la génèse des chromoplastes dans chacune des deux régions du fruit de tomate « cerise », à l'aide de la technique du cryo-décapage qui conserve intégralement les inclusions lipophiles. Nous avons plus particulièrement centré notre intérêt sur la description des chromoplastes de la « pulpe » du fruit qui, à l'inverse de ceux de la « chair », n'ont pas encore fait l'objet d'études approfondies.

2. Matériel et Méthodes

Les différents stades de la maturation des fruits ont été définis dans les travaux précédents (Laval-Martin 1969, Laval-Martin *et al.* 1972). Obtenus en jardin expérimental, les fruits verts croissent jusqu'à ce que leur diamètre atteigne de 12 à 15 mm. La croissance en taille achevée, leur coloration vire du vert au rouge très intense à maturité complète.

2.1. Extraction des plastes

Pour chacun des stades étudiés, la pulpe ou la chair prélevée est broyée dans un ultra-turax pour les stades verts, ou par écrasement ménagé à travers quatre couches de gaze, pour les

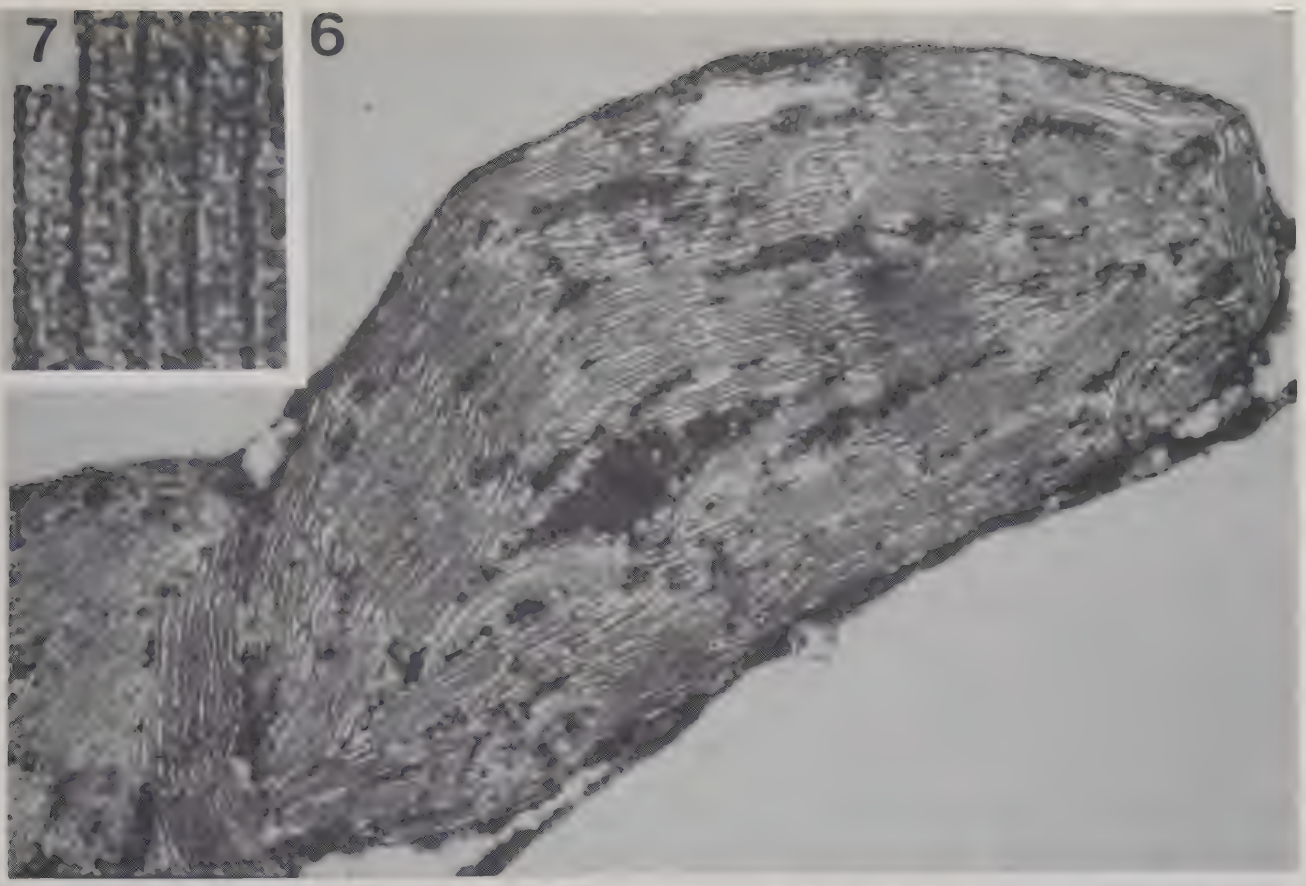
---

Fig. 6. Chloroplaste de la « chair » d'un fruit vert adulte de 15 mm de diamètre. × 33 000

Fig. 7. Détail d'un granum de la « chair » d'un fruit vert adulte. Les zones de partition sont très denses aux électrons. × 140 000

Fig. 8. Réplique d'un chloroplaste de la « chair » d'un fruit vert adulte. Les membranes présentent des faces (*f*) de fracture. × 36 300

Fig. 9. Chloroplaste isolé à partir de la « pulpe » de fruit vert adulte. × 30 000


7
6

8
f

9

stades rouges, en présence d'un volume égal de tampon Na_2HPO_4 — KH_2PO_4, 0,15 M, pH 7,4, contenant du saccharose à la concentration finale de 0,3 M pour le stade vert et de 0,6 M pour les fruits rouges. Après 20 minutes de centrifugation à 4000 g le culot vert est entouré d'un anneau de membranes blanches. Le seul matériel chloroplastique est remis en suspension, à l'aide d'un pinceau, dans 16,5 ml de tampon d'extraction, auxquels sont ajoutés 67,5 ml du même tampon contenant 75% de saccharose. Après homogénéisation, une centrifugation à 23 000 g durant 30 minutes permet d'obtenir un culot inférieur contenant les débris cellulaires, les noyaux et divers fragments tandis que le culot latéral et l'anneau surnageant sont enrichis en plastes entiers.

2.2. Techniques d'observation ultrastructurale, cryodécapage

Pour les techniques de cytologie classique, le matériel est préfixé au glutaraldehyde à 4% dans le tampon Sörensen pH 7, puis postfixé par une solution d'acide osmique à 1% dans le même tampon, il est déshydraté par des bains successifs enrichis en alcool et inclus dans un mélange épon-araldite.

Au cours de ces opérations et surtout au moment de la deshydratation, l'utilisation des solvants organiques dissout les substances liposolubles contenues dans les plastes : ainsi lipides, chlorophylles et caroténoïdes sont partiellement extraits, le stroma peut prendre un aspect coagulé et les contours de certaines accumulations peuvent s'estomper. L'utilisation du Durcupan (LEFORT-TRAN 1970) permet une déshydratation moins brutale. Toutefois la technique qui préserve totalement les structures et les accumulations de nature lipophiles et celle du cryodécapage, nous l'avons donc préférée, tout particulièrement au moment de l'étude des chromoplastes.

Le matériel (fragments de tissu ou culot de plastes) dans le tampon saccharosé, sans addition de glycérol, est déposé sur pastille d'or. Il est congelé rapidement au fréon, à — 170 °C et conservé dans l'azote liquide. Les répliques sont obtenues à l'aide d'un appareil Balzers, selon la technique de MOOR (1964 et 1969), à — 150 °C, avec un temps de sublimation de 2 à 3 minutes, une vaporisation de platine de 8 à 12 secondes et une vaporisation de carbone de 7 à 10 secondes.

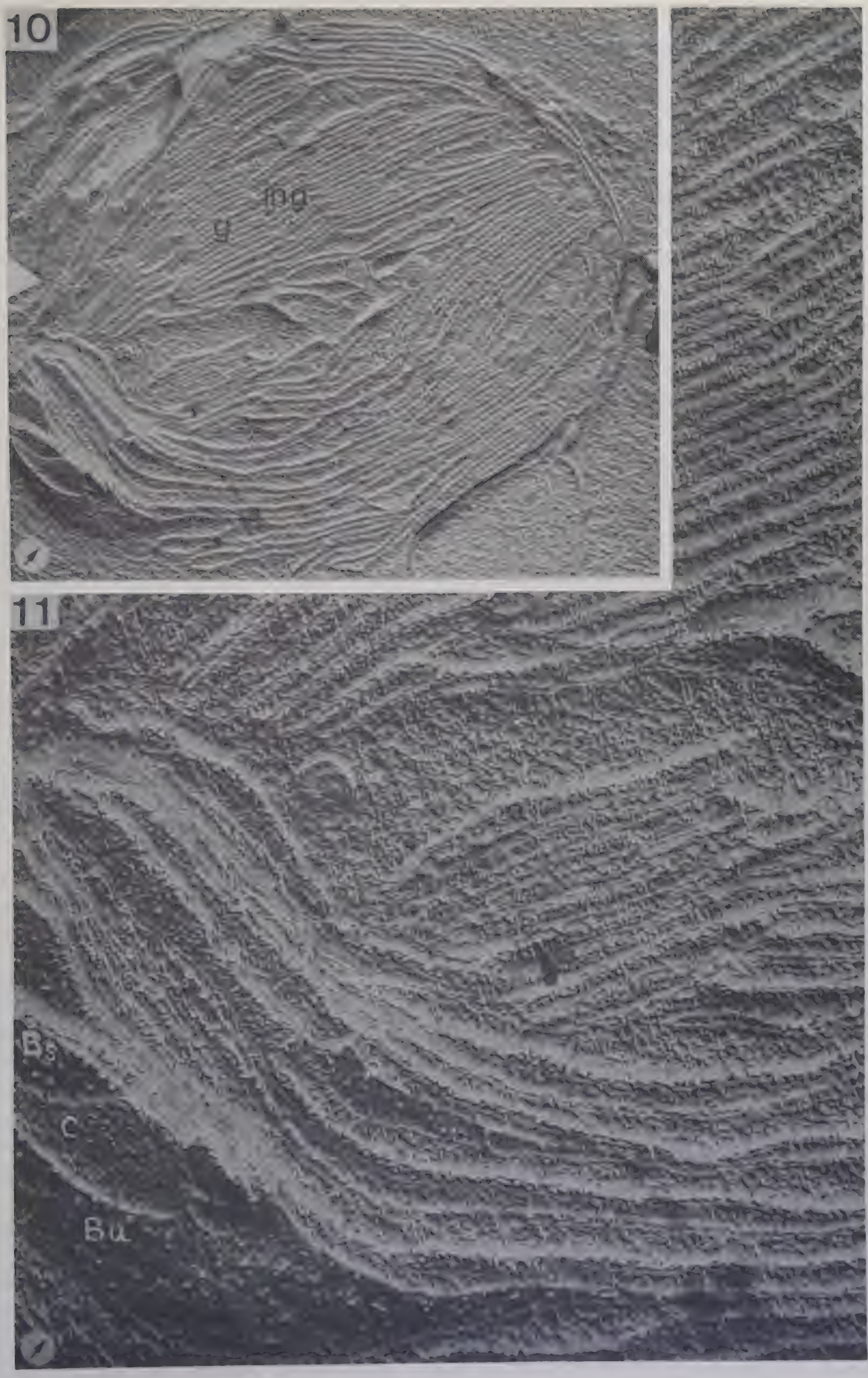
Toutes les observations ont été réalisées à l'aide du porte objet haute résolution, sur un microscope électronique Hitachi HU 11 A, qu'il s'agisse des répliques, ou bien des coupes faites à l'aide d'un ultramicrotome L. K. B., et post colorées à l'acétate d'uranyle en solution aqueuse à 5% et à l'acétate de plomb (REYNOLDS 1963).

2.3. Techniques de séparation des fractions plastidiales

Les plastes isolés sont mélangés à un volume égal de tampon Sörensen, pH 5, saccharosé (2,25 M). Le culot obtenu après une centrifugation de 10 mn à 30 000 × g est récupéré, congelé à l'azote liquide et broyé vigoureusement dans un mortier ; déposé sur un gradient continu de saccharose, de 65% à 8% dans le même tampon Sörensen à pH 5, il est centrifugé 45 minutes à 25 000 × g. Les mêmes fractions, dialysées une nuit contre du tampon acétate d'ammonium M/100, pH 7, sont observées après coloration par l'acide phosphotungstique à 1% et servent de contrôle en microscopie électronique.

Fig. 10. Réplique d'un chloroplaste isolé de la « pulpe » de fruit vert adulte. Zones granaires (*g*) et intergranaires (*ing*). ×27 000

Fig. 11. Détail de la Fig. 10 montrant les trois types de faces de fractures des membranes (B_s, *C et* B_u). ×84 500


10
11
Bs
C
Bu

2.4. Techniques d'analyse pigmentaire

Simultanément avec les études ultrastructurales, la composition pigmentaire des fruits, cueillis à divers stades de croissance et de maturation, congelés à l'azote liquide et lyophilisés, a été analysée séparemment sur la « chair » et la « pulpe ». Les quantités de chlorophylles *a* et *b* ont été déterminées cinétiquement (Delaporte et Laval-Martin 1971 a, 1971 b) et les pigments caroténoïdiens, séparés par chromatographie sur colonne puis dosés (Monéger 1968). L'ensemble de ces résultats a été précédemment publié (Laval-Martin, Quennemet et Moneger 1972).

3. Resultats

3.1. Étude du fruit en croissance

3.1.1. Plastes de « la chair »

Sur des fruits immatures de 5 à 9 mm de diamètre, soit à la moitié de leur complet développement et où l'on ne dose qu'entre 1/5 et 1/3 de la chlorophylle normalement présente chez les fruits verts adultes ; on observe des plastes de 1 à 3 µm (Fig. 1) caractérisés par une matrice dense, au sein de laquelle on distingue souvent des enclaves importantes (Fig. 1, *ep*) limitées par une membrane unique (Fig. 1, *Mb*). Celles ci rappellent celles qui ont été observées dans le parenchyme des coupes réceptaculaires florales du pêcher (Eymé 1971) et dans les feuilles panachées de *Coleus blumei* (Marty 1973) ; elles pourraient être de nature protéique. Autour de ces enclaves s'observent quelques thylacoïdes indépendants (Fig. 1, *thy*) ou appariés et qui paraissent se former à partir du feuillet interne de la membrane du plaste (Fig. 2, *i*). La disposition des ribosomes, au sein du cytoplasme, semble indiquer une synthèse protéique active dans ces tissus méristèmatiques.

Au cours de l'évolution de ces proplastes, le nombre des thylacoïdes augmente ; ils sont disposés en chapelets parallèles (Fig. 2) et certains d'entre eux en ébauches d'empilements granaires (Fig. 2, *g*).

Dans les fruits verts plus développés, dont la taille atteint de 10 à 12 mm et dont la « chair » contient les deux tiers des chlorophylles par rapport au

---

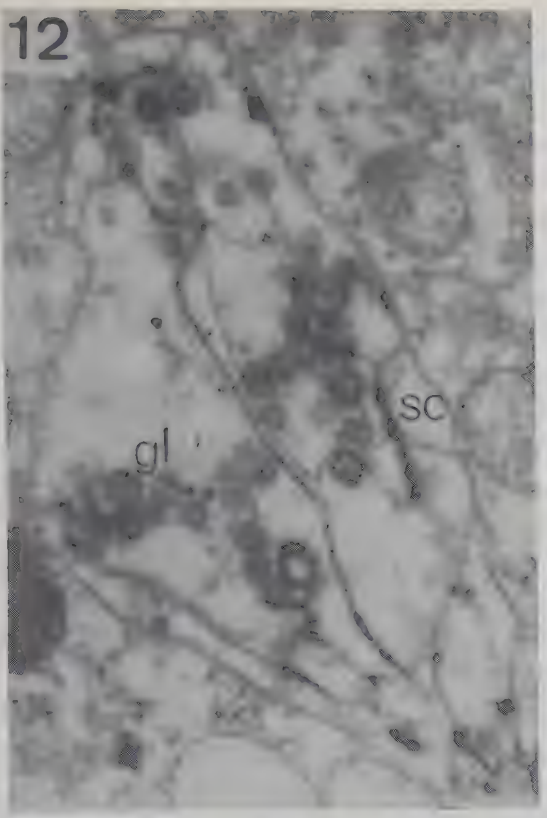
Fig. 12. Coupe d'un chromoplaste de la « chair » en cours de maturation. Globules (*gl*), dépôts semi-cristallins (*sc*) associés à des restes membranaires. ×24 600

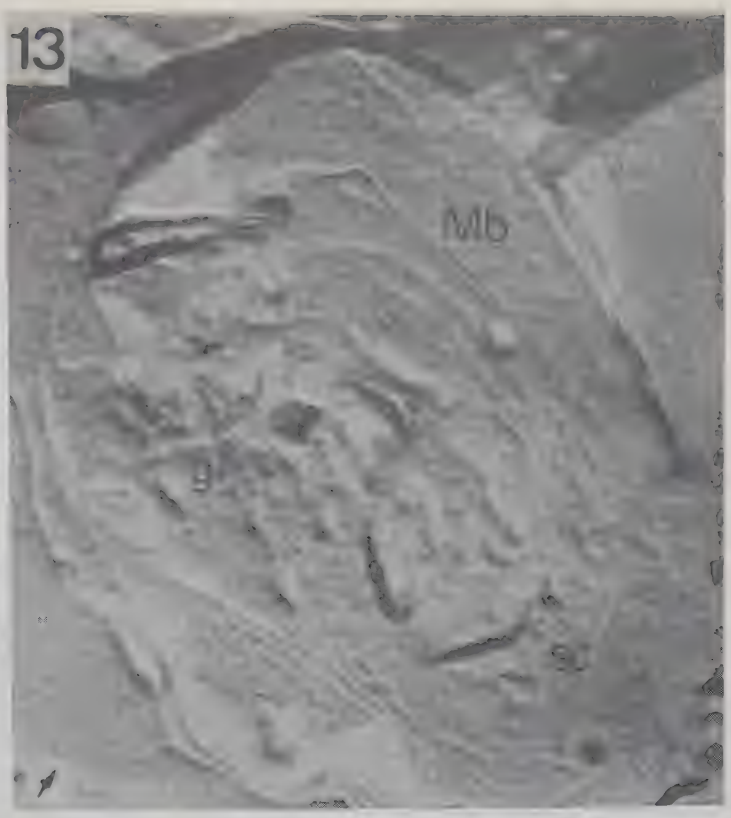
Fig. 13. Cryodécapage dans un chromoplaste de la « chair », en cours de maturation. Les dépots semi-cristallins (*sc*), rigides apparaissent dans le lumen de grandes membranes (*Mb*), des globules (*gl*) sont présents. ×46 400

Fig. 14. Coupe « in situ » d'un chromoplaste de « chair » mûre : l'élution des inclusions semi-cristallines fait apparaitre des espaces clairs (*ec*). Les globules (*gl*) présentent un faible contraste. ×23 200

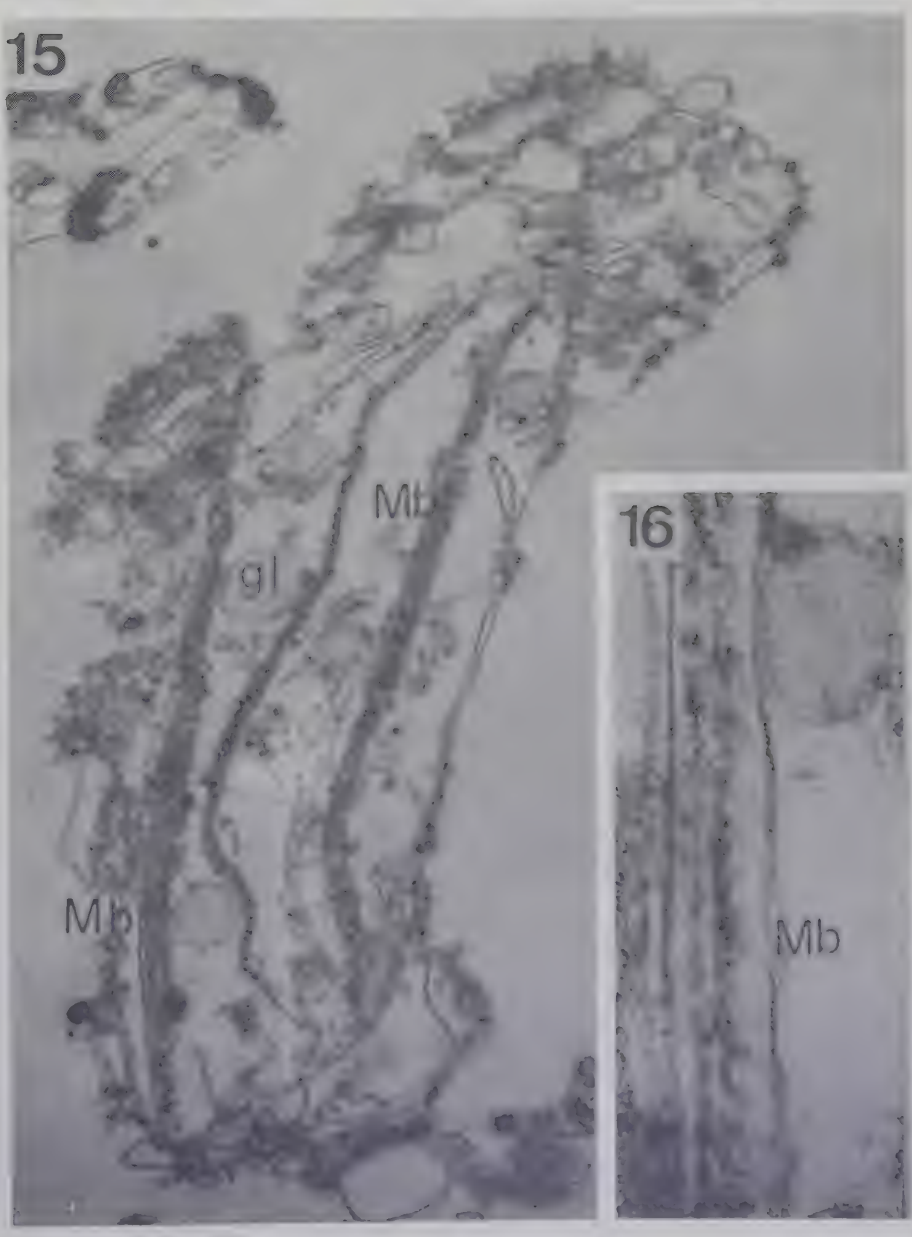
Fig. 15. Coupe d'un chromoplaste isolé à partir de la « chair » mûre, les globules (*gl*) comme les accumulations semi-cristallines (*sc*) sont bordées d'un feuillet membranaire (*Mb*). ×27 000

Fig. 16. Détail d'une accumulation semicristalline partiellement éluée, les feuillets membranaires (*Mb*) adjacents sont nets. ×89 300


12
gl
sc


13
Mb
gl

14
gl


15
Mb
gl
Mb

16
Mb

témoin ; les proplastes du stade précédent se sont rapidement différenciés en développant un nombre important de membranes photosynthétiques ; ils comprennent un réseau de thylacoïdes organisés en très nombreuses zones granaires (Fig. 3, *g*), on note encore des invaginations du feuillet interne de la membrane, qui paraissent contribuer à la formation de nouveaux thylacoïdes (Fig. 3, *i*). Des globules osmiophiles de 1200 Å environ sont parfois présents (Fig. 3, *gos*).

3.1.2. Plastes de la « pulpe »

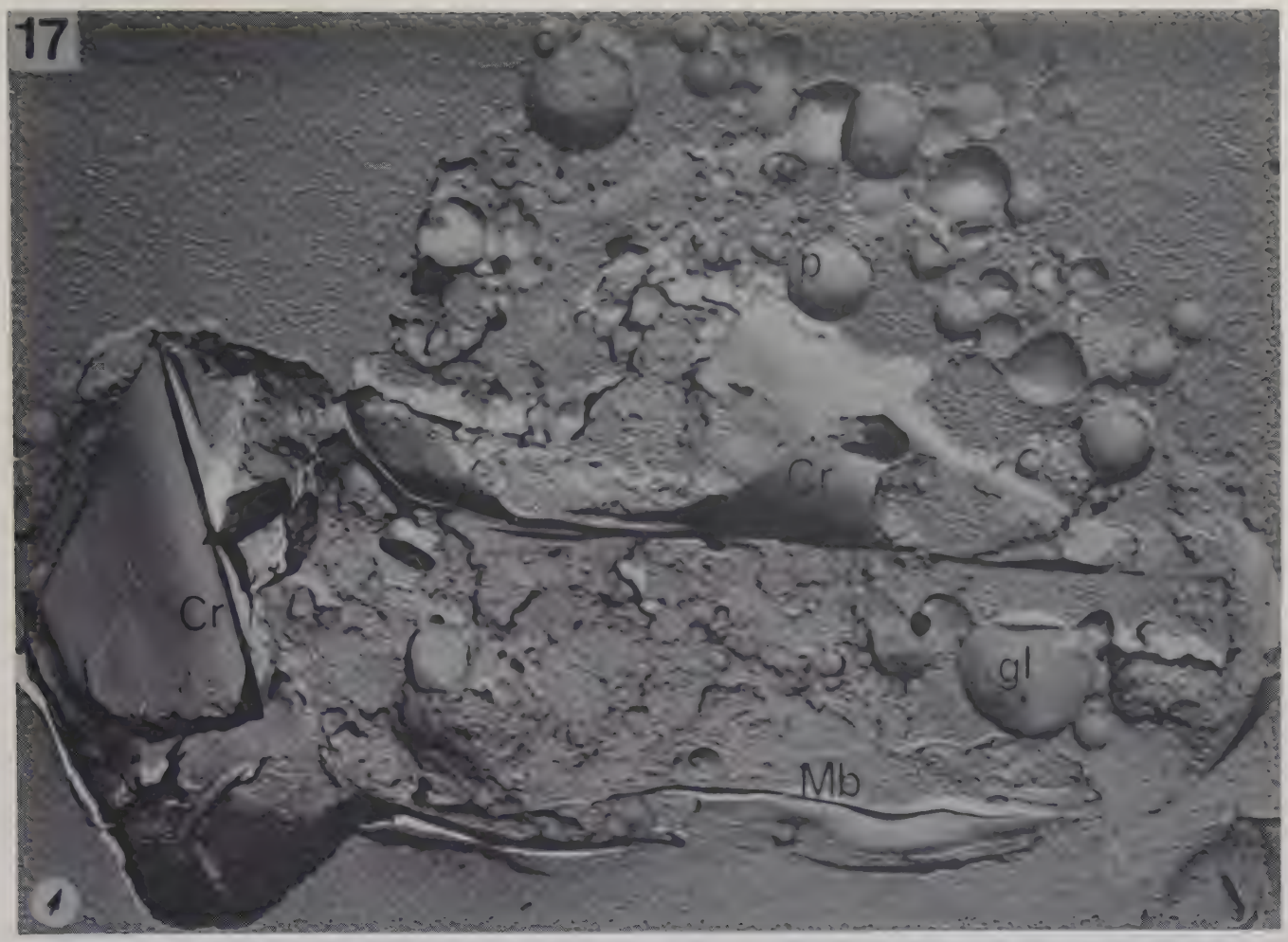
Dans la « pulpe » des stades immatures correspondants (fruits de 5 à 6 mm de diamètre) ; à la différence de ce qui a été observé dans la « chair », on rencontre des plastes de petite taille (0,4 à 2 µm), mais dont l'organisation membranaire interne est déja celle d'un chloroplaste (Fig. 4). L'amidon est parfois présent (Fig. 4, *Am*). Les zones granaires y sont nettement différenciées et formées d'un empilement d'une dizaine de thylacoïdes (Fig. 4, *g*), avec des partitions bien visibles (Fig. 5).
On doit rappeler que cette zone du fruit, qui ne contient alors qu'un huitième environ des chlorophylles présentes au stade vert adulte, subit une multiplication cellulaire beaucoup plus importante que celle de la « chair ».

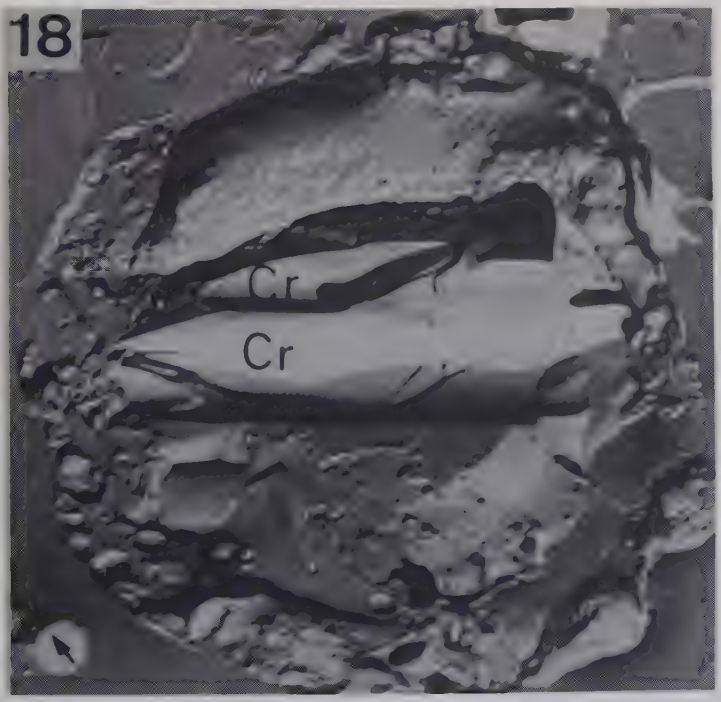
3.2. Étude du fruit vert adulte

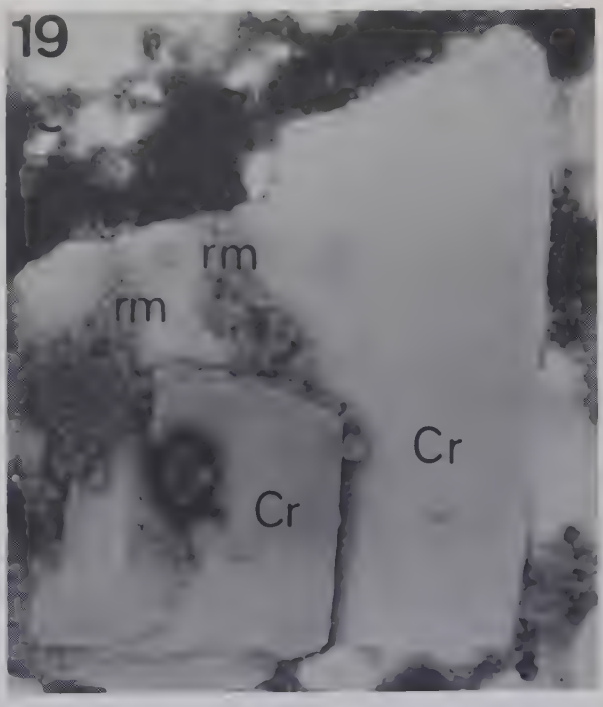
3.2.1. Chloroplastes de la « chair »

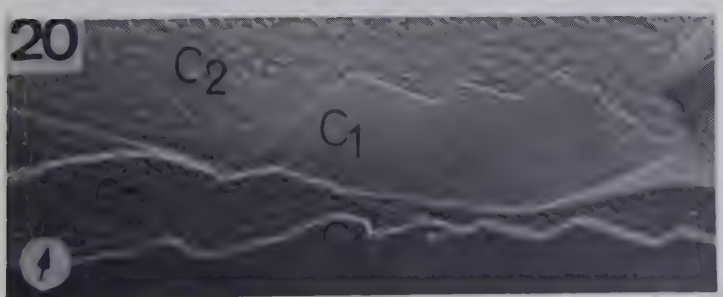
Les chloroplastes observés *in situ* sur coupe (Fig. 6) ou sur réplique (Fig. 8) sont disposés à la périphérie des cellules, dans l'étroite bande de cytoplasme comprise entre la vacuole et la membrane pectocellulosique. Ils sont riches en amidon, contiennent un petit nombre de globules osmiophiles de 500 à 1200 Å et présentent de nombreuses zones granaires constituées de 6 à

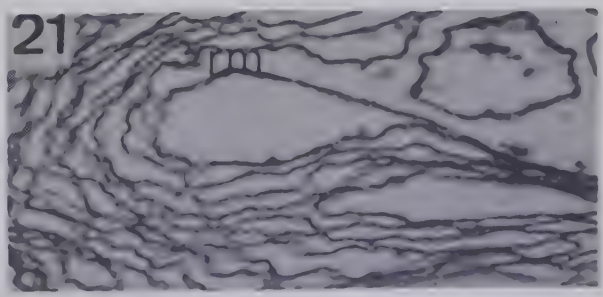
Fig. 17. Cryodécapage dans un chromoplaste isolé de la « chair » de fruit mûr. Nombreux globules (*gl*) avec des particules (*p*) sur les surfaces de fractures ; des plaques semi-cristallines (*Cr*) incurvées sont isolées du stroma par une membrane (*Mb*). ×15 200
Fig. 18. Cryodécapage dans un chromoplaste isolé de la « chair » de fruit mûr. Les plaques cristallines (*Cr*) sont disposées les unes sur les autres et enroulées, formant de volumineuses inclusions qui traversent le chromoplaste. ×12 000
Fig. 19. Coloration négative de cristaux (*Cr*) de lycopène, associés à des restes membranaires (*rm*) et obtenus par fractionnement de chromoplastes isolés à partir de la « chair » de fruits mûrs. ×19 500
Fig. 20. Cryodécapage de ces même cristaux de lycopène, « *in situ* » dans un chromoplaste isolé de la « chair » de fruits mûrs. On y observe une alternance de couches C_1 et C_2. ×44 000
Fig. 21. Restes membranaires (*rm*) observables sur des coupes de chromoplastes isolés de la « chair » de fruits mûrs, après déshydratation à l'éthanol-oxyde de propylène. ×37 000


17
c
p
Cr
c
Cr
gl
Mb


18
Cr
Cr


19
rm
rm
Cr
Cr


20
C2
C1


21
pm

20 thylacoïdes et dont les accolements bien différenciés, sont très denses aux électrons (Fig. 7).
Les observations sur répliques en cryodécapage confirment l'organisation des chloroplastes vus sur coupes et permet en outre de retrouver, sur les plans de membranes révélés par fracture, au moins trois types de surfaces caractérisées par la distribution et la taille des particules présentes (Fig. 8, *f*).

3.2.2. Chloroplastes de la « pulpe »

Les chloroplastes que l'on peut observer dans la « pulpe » des fruits verts parvenus à leur complet développement, soit 15 mm de diamètre, ont une forme sphérique (Fig. 9 et 10). Leur taille excède rarement 3 µm et ils renferment parfois des réserves d'amidon. Sur les répliques obtenues après cryodécapage, les chloroplastes de ce type possèdent un système membranaire fortement structuré en zones granaires de 15 à 30 thylacoïdes empilés (Fig. 10, *g*) et en zones intergranaires bien différenciées (Fig. 10, *ing*). Les surfaces membranaires fracturées permettent d'observer (Fig. 11) au moins trois types de faces. L'une avec une population hétérogène de particules dont la densité et d'environ 1300 particules au µm² et dont les tailles varient entre 100 et 130 Å. Cette face qui porte aussi un certain nombre de cratères a une position interne par rapport au lumen, qui permet de l'assimiler à une face B_{ii}, selon la nomenclature de GOODENOUGH et STAEHELIN (1971). Une autre densément (5000 au µm²) recouverte de plus petites particules de 90 Å, rappelle une face de type C et pourrait être complémentaire de la précédente, donc C_{ii}. Enfin une troisième face avec de grosses particules de 160 Å environ, à raison de 1400 par µm², serait de type B_s. Il est plus difficile d'identifier la quatrième face C_s complémentaire de B_s.
Observés dans des fruits de 15 mm de diamètre, ces chloroplastes bien différenciés de la « pulpe », qui peuvent être isolés relativement aisément

---

Fig. 22. Plaste isolé de « pulpe » en début de maturation. A l'intérieur du plaste limité par son enveloppe (*E*) les grana (*g*) se désorganisent, certains des thylacoides extrèmes ont un lumen dilaté (*thy d*). ×19 500

Fig. 23. Détail de thylacoides dilatés (*thy d*) tendant vers une forme sphérique, « pulpe » en début de maturation. ×25 000

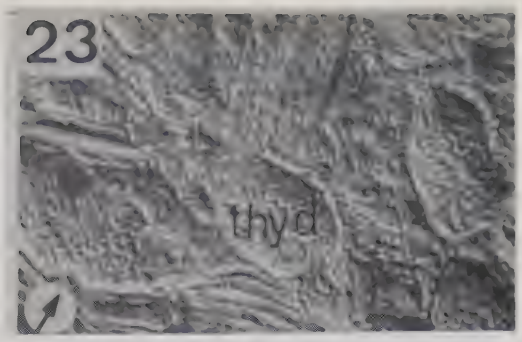
Fig. 24. Chromoplastes de la « pulpe » de fruits à demi mûrs. Gros globules (*gl*) à faible contraste et longues lamelles (*L*). ×27 000

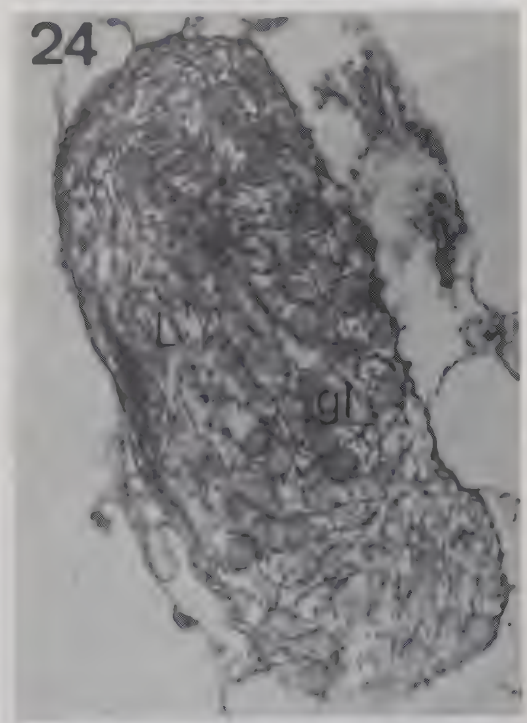
Fig. 25. Cryodécapage dans un chromoplaste isolé de « pulpe » de fruits à demi mûrs. Globules (*gl*) de taille variée, restes lamellaires (*L*) et grana (g). ×14 500

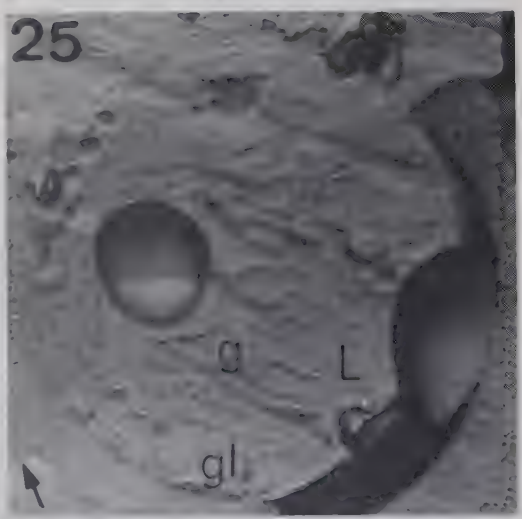
Fig. 26. Cryodécapage dans un chromoplaste isolé de « pulpe » de fruits presque mûrs. Globules (*gl*) montrant des particules (*p*) à leur surface, restes lamellaires (*L*) parfois enroulés. ×25 500

Fig. 27. Coupe d'un chromoplaste isolé à partir de « pulpe » de fruits mûrs. Les membranes qui limitent les globules vidés de leur contenu, se présentent sous forme de vésicules (*v*) ; de longs restes lamellaires (*L*) sont présents. ×27 000

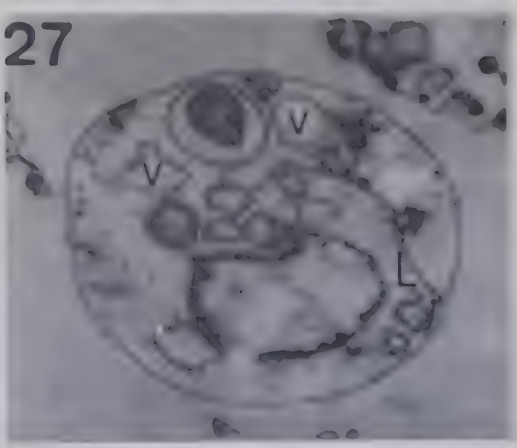
22
g
thyd
E


23
thyd


24
L
gl


25
g
L
gl

26
L
gl
E


27
v
v
L

(Fig. 10), vont représenter le stade témoin et leur évolution progressive en chromoplastes va constituer l'essentiel de notre étude.

3.3. Étude du fruit en cours de maturation

3.3.1. Plaste de la « chair »

3.3.1.1. Plastes in situ ou isolés. Dans les fruits roses où les teneurs en chlorophylles ne sont plus que 30% des teneurs initiales et où se produisent des néosynthèses de pigments caroténoidiens, les processus de maturation sont déja entamés. Les chloroplastes ont un système membranaire désorganisé et leur stroma s'emplit d'inclusions dont les unes, globulaires, offrent un contraste variable aux colorants et dont les autres sont de structure semi-cristalline (Fig. 12 et 13, *gl* et *sc*).

Lorsque le fruit évolue vers la maturité et devient rouge ; il accumule en quantité tout à fait remarquable le lycopène, le volume des accumulations semi-cristallines augmente alors. Sur coupes elles sont plus ou moins éluées par les solvants de déshydratation (alcool éthylique, oxyde de propylène), laissant à leur place des zones claires (Fig. 14, *ec*), applées « pigments cristalloid remnants » par certains auteurs (SPURR et HARRIS 1968, HARRIS et SPURR 1969 a). Autour de ces pseudocristaux, persistent des structures de type membranaire visibles tant sur réplique (Fig. 13, *Mb*), que sur chromoplaste isolé inclus (Fig. 15 et 16, *Mb*). Dans de tels chromoplastes, on observe des globules à contraste électronique variable (Fig. 14 et 15, *gl*).

Les répliques obtenues après cryodécapage, permettent d'affirmer que les accumulations cristalloïdes, décrites sur coupes, sont des lames enroulées, de grande dimension et traversant le chromoplaste (Fig. 17 et 18, *Cr*). Il semblerait possible d'admettre que le cristal est constitué de feuillets (Fig. 18 et 20), étroitement empilés, à alternance de couches C_1, présentant des granulations fines (60 Å) et de couches C_2 à granulations plus grossières (200 et même 400 à 500 Å), sans doute caractèristiques de différences de polarité.

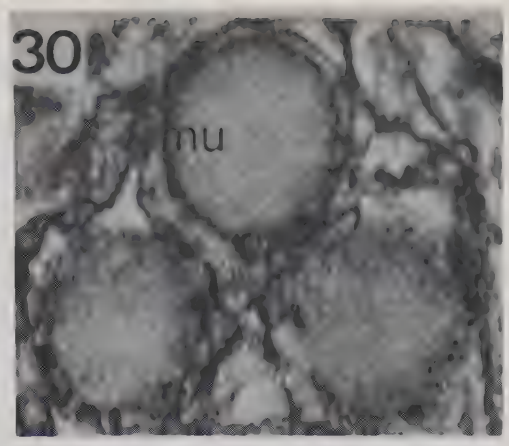
Fig. 28. Cryodécapage d'un chromoplaste isolé de « pulpe » de fruits mûrs. Les globules (*gl*) dont les surfaces présentent des particules (*p*) gorgent le stroma du plaste, déformant la double enveloppe limitante (*E*). ×28 500

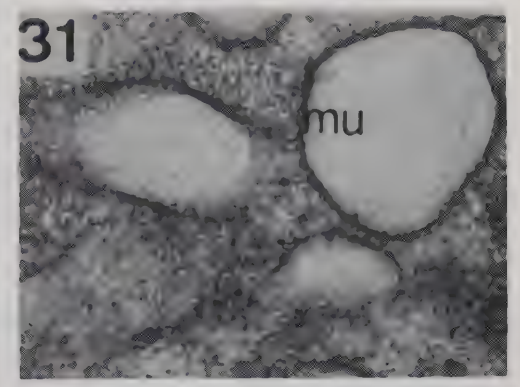
Fig. 29. Cryodécapage d'un type de chromoplastes rarement rencontré dans la pulpe des fruits mûrs. Globules et volumineuse aiguille de β-carotène (*Ag*). ×22 200

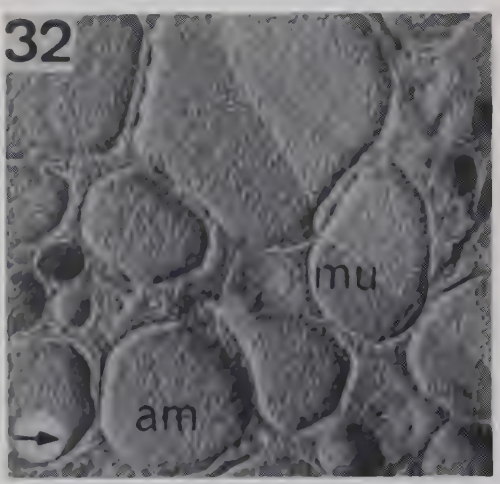
Fig. 30, 31, 32, 33 et 34. Différents clichés de chromoplastes isolés de la « pulpe » de fruits mûrs, montrant la présence d'une membrane unitaire (*mu*) autour des globules (*gl*) de β-carotène sous forme amorphe (*am*). Fig. 30. Matériel déshydraté à l'aide de Durcupan. ×127 000. Fig. 31. Matériel déshydraté à l'éthanol et à l'oxyde de propylène. ×56 200. Fig. 32. Cryodécapage montrant des fractures dans la masse des globules. ×28 500. Fig. 33. Cryodécapage découvrant les particules à la surface des globules fracturés. ×47 500. Fig. 34. Coloration négative des globules de β-carotène isolés après fractionnement des chromoplastes. ×89 500

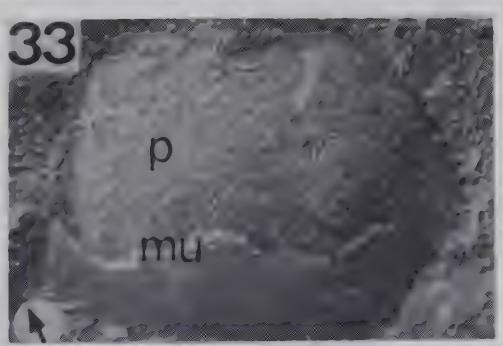
28
p
E
gl
gl

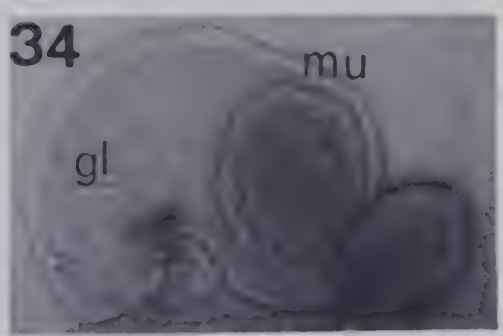
29
Ag


30
mu


31
mu


32
mu
am


33
p
mu


34
mu
gl

L'élution des cristaux de lycopène, par les solvants de déshydratation, pourrait laisser en place les membranes unitaires qui prendraient alors une configuration myélinique (Fig. 21, *rm*), comparable à celle déja signalée par les auteurs ayant décrit, sur coupe, ce genre de chromoplaste (Rosso 1967, 1968, Ben-Shaul et Naftali 1969, Harris et Spurr 1969 a, 1969 b, Laval-Martin 1969, Harris 1970).

3.3.1.2. Fractionnement à partir de la « chair » de fruit rouge. Sur des chromoplastes isolés (Fig. 15), puis cassés, nous avons séparé sur gradient, puis observé en coloration négative, une fraction rouge qui a pour spectre d'absorption celui du lycopène. Cette fraction présentait à l'observation en microscopie électronique, ces mêmes lamelles cristalloïdes empilées (Fig. 19, *Cr*), toujours associées à des restes membranaires (Fig. 19, *rm*).

3.3.2. Plastes de la « pulpe »

3.3.2.1. Plastes isolés. Dans le fruit rose, les plastes de la « pulpe » qui ont perdu 50% des pigments chlorophylliens initiaux, présentent un réseau de thylacoides distendu et localement désorganisé (Fig. 22). Certains des thylacoides granaires ont le lumen dilaté et acquièrent une forme sphérique (Fig. 22 et 23, *thy d*).

A un stade ultérieur de maturation, au moment où certains carotènes commencent à s'accumuler : le plaste, dans le stroma duquel persistent quelques granums (Fig. 25, *g*) et surtout de longs restes lamellaires (Fig. 24—26, *L*), contient des globules de taille variable pouvant atteindre jusqu'à 1 µm de diamètre (Fig. 24—26, *gl*). Lorsqu'au cours du cryodécapage la fracture se fait à la surface d'un de ces globules, il est possible d'y distinguer de petites particules (Fig. 26, *p*).

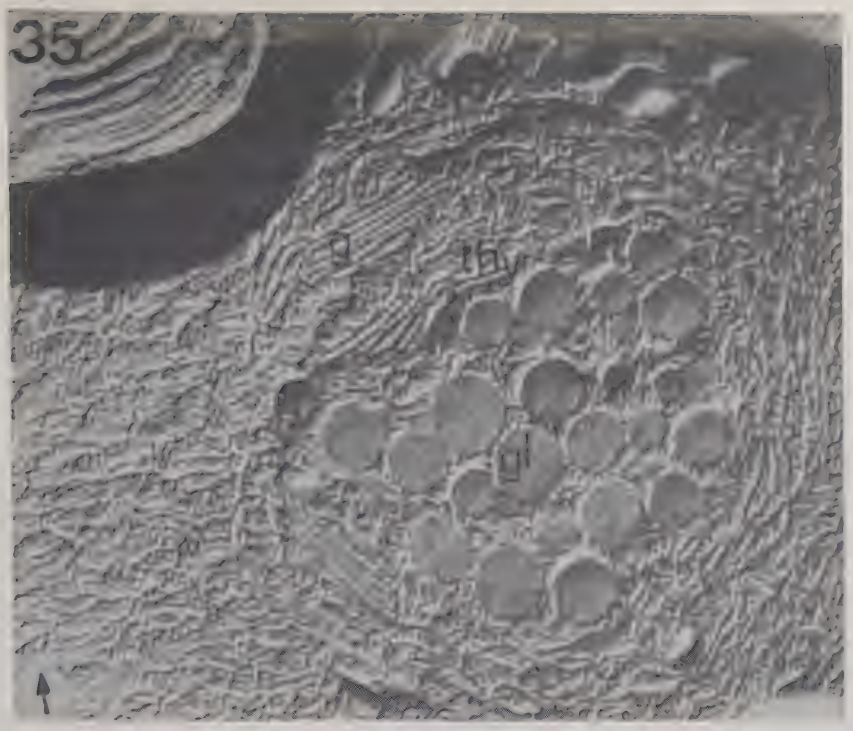
Fig. 35. Cryodécapage dans un chromoplaste isolé de la « chair » murie à 30 °C, où la synthèse de lycopène est inhibée ; seuls sont visibles les globules (*gl*) qui ont été fracturés dans leur masse, et des restes de granum (*g*). ×22 600

Fig. 36. Détail des globules accumulés dans ces chromoplastes. Les fractures à la surface de ces globules (*gl*) montrent la présence des deux feuillet de la membrane unitaire (*mu*) et les particules (*p*). ×31 000

Fig. 37. Chromoplaste isolé de la « chair » de fruits mûrs. Ce plaste allongé montre que les plaques de lycopène peuvent former une sorte de carapace sous la double enveloppe limitante. ×12 200

Fig. 38. Vue externe d'un chromoplaste isolé de « pulpe » de fruits mûrs. Les globules font saillie. Lorsque des fractures se produisent dans l'enveloppe limitante du chloroplaste, des particules (*p*) sont révélées, rappelant celles observées à la surface des globules lorsqu'ils sont fracturés à l'intérieur du stroma. ×11 500

Fig. 39. Les globules de carotène des chromoplastes de la « pulpe » de fruits mûrs semblent parfois formés par un sac membranaire qui s'est invaginé et replié sur lui même (*gl inv*). ×24 000


35
gl

36
gl
p

37

38
p

39
gl

Au stade ultime de la maturation, alors que la quantité de β-carotène accumulé dans les plastes de cette région du fruit, est maximale et égale à quatre fois ce qu'elle était dans les chloroplastes du stade vert adulte ; il est possible d'isoler des chromoplastes montrant, sur coupes, après déshydratation par les solvants organiques usuels, des vésicules plus ou moins sphériques (Fig. 27, *v*) limitées par une membrane unitaire (Fig. 27, *mu*) et dont le contenu est plus ou moins élué. De tels chromoplastes, étudiés sur répliques, montrent un stroma gorgé de globules très nombreux et de taille variée (Fig. 28). Lorsque ces globules sont fracturés dans leur masse, celle-ci présente un aspect homogène, comme si une matière amorphe les constituait (Fig. 32, *am*). Lorsque les fractures s'opèrent dans l'épaisseur le la membrane qui limite ces globules (Fig. 32, *mu*), il est possible de découvrir, sur les interfaces hydrophobes, des petites particules de 100 Å environ (Fig. 33, *p*), qui ne sont pas sans rappeler, tant par leur taille que par leur densité de répartition, celles observables dans certains types de membranes chloroplastiques indépendantes. Lorsque ces mêmes globules sont observés sur coupes (Fig. 30 et 31) et que les procédés de déshydratation les ont totalement vidés de leur contenu carotènoïdien ; il est possible de distinguer les feuillets limitants, dont l'épaisseur totale devient alors mesurable et voisine de 100 Å (Fig. 31, *mu*).

Il ne nous a été que très rarement possible d'observer de grosses aiguilles de β-carotène (Fig. 29, *Ag*) comparables à celles décrites par les auteurs travaillant sur la racine de *Daucus carota* (STRAUS 1953, 1956, STEFFEN et RECK 1964, BEN-SHAUL et KLEIN 1965, FREY-WYSSLING et SCHWEGLER 1965, TOYAMA 1967, BEN-SHAUL, TREFFRY et KLEIN 1968) et signalées par HARRIS et SPURR 1969 a) dans le « high β-caroten mutant » de *Lycopersicon.*

3.3.2.2. Fractionnement à partir de la « pulpe » du fruit rouge. Nous avons pu isoler sur gradient une fraction jaune présentant un spectre d'absorption peu différent de celui du β-carotène. Cette fraction étudiée en coloration négative a montré ces mêmes globules (Fig. 34, *gl*).

3.4. Étude des chromoplastes de la « chair » de fruits muris à 30 °C

Les Fig. 35 et 36 représentent les chromoplastes observables dans la « chair » de fruits mûris à 30 °C, température à laquelle la synthèse de lycopène est totalement inhibée (BEN-SHAUL et NAFTALI 1969), et où nous avons montrè (LAVAL-MARTIN *et al.* en préparation) une teneur finale des chromoplastes en β-carotène légèrement inférieure à celle du témoin. La morphologie de ces chromoplastes est très voisine de celle des chromoplastes habituellement décrits dans la « pulpe » de fruits mûris sous des conditions normales. Ils sont donc sphériques et leur stroma est encombré d'inclusions globulaires (Fig. 35 et 36, *gl*). Ils présentent, à des stades intermédiaires, des restes d'empilements granaires (Fig. 35, *g*).

4. Discussion

Ces observations ultrastructurales sont discutées en liaison étroite avec les résultats biochimiques précédemment obtenus et rappelés succintement Tableau 1 (Laval-Martin, Monéger et Quennemet 1972 et en préparation). Dans les chloroplastes des deux régions du fruit vert, qui montrent une structure granaire classique, les pigments dosés sont par ordre d'importance décroissante : les chlorophylles, le β-carotène, la lutéine, le mélange auro-

Tableau 1. *Teneurs en µg de pigment par fruit, à cinq étapes importantes du développement.* (Laval-Martin, Quennemet et Monéger 1972)

	« Pulpe » du fruit			« Chair » du fruit		
	Chlorophylles totales	β Carotène + lutéine	Lycopène	Chlorophylles totales	β Carotène + lutéine	Lycopène
Fruit vert en croissance :	10,3	0,8	0	12,7	0,7	0
Fruit vert adulte :	89,1	8,8	0	70,5	6,1	0
Fruit vert jaunàtre :	82,0	11,3	0	50,4	7,0	0
Fruit orangé :	40,3	11,1	1,0	21,0	12,8	14,6
Fruit rouge foncé :	2,1	24,5	19,8	traces	19,3	200,5

xanthine et violaxanthine, le mélange lycophylle et lycoxanthine et la néoxanthine. Dans ces chloroplastes, le rapport Chlorophylles *a* + *b*/β-carotène + lutéine est voisin de 10. Au début de la maturation ce rapport diminue par disparition d'une quantité importante de pigments chlorophylliens tandis que les teneurs en pigments caroténoïdiens demeurent constantes ou n'augmentent que très faiblement (β-carotène). Sur le plan structural aucune modification n'est alors décelable par les moyens dont dispose actuellement la microscopie électronique. Au niveau des membranes photosynthètiques s'opèrent des remaniements biochimiques importants comme l'addition de nouvelles molécules de caroténoïdes mais surtout la disparition de molécules de chlorophylles (Eilam et Klein 1962, Klein et Bogorad 1964, Ben-Shaul, Epstein et Schiff 1965, Duranton et Lefort-Tran 1968). Ces dernières, qui appartiennent sans doute à la catégorie des chlorophylles peu liées (Deroche 1969), ne jouent pas de rôle essentiel dans le maintien des édifices macromoléculaires qui constituent les lamelles photosynthétiques (Menke 1963, Murakami 1964, Weier et Benson 1966).

Quand au cours de l'évolution du fruit, ce même rapport chlorophylles $a + b$/β-carotène + lutéine chute à une valeur voisine de 3 : on observe une désorganisation importante du système membranaire chloroplastique. Il y a distorsion des arrangements membranaires initialement parallèles et gonflement de certains des thylacoides occupant une position externe par rapport aux grana. Ces changements ultrastructuraux sont très comparables à ceux induits par des extractions ménagées de chlorophylles, dans les chloroplastes d'épinard (Murakami et Nobel 1967). L'architecture membranaire des chloroplastes parait être sous l'étroite dépendance du rapport entre les différents systèmes pigmentaires. Un équilibre précis est nécessaire entre quantités et qualités de pigments, caroténoïdes d'une part et chlorophylliens d'autre part, pour que puisse s'édifier puis se maintenir, dans les chloroplastes, l'organisation ultrastructurale membranaire qui les caractèrise.

Des relations ont été établies entre la conformation des membranes et leur rôle dans le transport des ions H^+ (Mitchell 1966). Par ailleurs Goodenough et Staehelin (1971) ont montré les conséquences que peuvent avoir, sur l'accolement des membranes photosynthétiques, des variations de force ionique intrastromatique. On pourrait donc invoquer au cours de la maturation, un changement de perméabilité de la double enveloppe limitante du plaste, qui entrainerait des variations de la force ionique intrastromatique. Les remaniements biochimiques et ultrastructuraux ainsi induits conduiraient à la libération de certaines molécules de pigments constitutives des membranes, qui pourraient alors soit disparaitre, dans le cas des chlorophylles non renouvelées, soit être relachées à l'intérieur des lumens dans le cas des caroténoides. Au contraire d'Harris et Spurr (1969 a, 1969 b) qui supposent une localisation exclusive des chlorophylles et des caroténoïdes au niveau de la partition, nous n'accordons pas à cette différenciation membranaire une importance prépondérante. Nos analyses biochimiques (Tableau 1) ont en effet montré que dès l'apparition, dans les proplastes, de thylacoides indépendants : chlorophylles et caroténoïdes sont présents.

Lorsque les teneurs en chlorophylles ne sont plus égales qu'à 50% de leurs valeurs initiales puis qu'elles continuent de décroitre : la désorganisation granaire amorcée se poursuit par l'apparition de structures dérivées de thylacoides, contemporaine de néosynthèses caroténoïdiennes importantes.

Dans la zone interne du fruit ou « pulpe », les structures qui semblent provenir de la dilatation de thylacoides granaires sont globoïdes ; lorsqu'elles deviennent nombreuses et qu'elles gorgent le stroma du plaste alors sphérique, elles peuvent faire saillie à sa surface en repoussant la double enveloppe limitante (Fig. 38). Ces inclusions croissent en nombre et en volume à l'intérieur du plaste, alors même que l'évolution pigmentaire indique une accumulation importante de β-carotène, dont la teneur est 3 à 4 fois plus élevée dans la « pulpe » du fruit mûr que dans la « pulpe » verte. Ces chromoplastes globuleux sont assez comparables à ceux décrits dans divers organes

floraux (Frey-Wyssling et Kreutzer 1958 a, Lance-Nougarède 1960, Lichtenthaler 1970), dans certains fruits (Frey-Wyssling et Kreutzer 1958 b, Thomson 1966, Harris et Spurr 1968), dans le parenchyme externe de pomme (Catesson et Mazliak 1968), ainsi que dans des feuilles sénescentes (Lichtenthaler 1969, Mlodzianowski et Kwintkiewicz 1973, Hernandez-Gil et Schaedle 1973).

Outre les structures globoïdes précedemment décrites, forme d'accumulation du β-carotène, on observe dans les chromoplastes de la zone externe du fruit ou « chair » de grandes structures d'aspect cristallin, qui prennent naissance dans les ex-lumens de grands thylacoides et peuvent soit traverser le chromoplaste, soit se retrouver disposées en carapace sous la double enveloppe limitante. Ces inclusions correspondent à la forme d'accumulation du lycopène, pigment totalement absent du fruit vert et dosable, en fin de maturation dans cette région du fruit, en quantité dix fois plus grande que le β-carotène. Ces grands chromoplastes rigides, de forme très allongée (Fig. 37), sont comparables à ceux déja décrits dans la tomate (Rosso 1967, 1968, Harris et Spurr 1969 a, 1969 b, Ben-Shaul et Naftali 1969, Laval-Martin 1969) ; mais aussi à ceux observés par Eymé (1971) dans les organes receptaculaires du pêcher. Le cryodécapage montre que ces grands dépots cristallins de lycopène ont une structure feuilletée très voisine de celle des cristaux de β-carotène observés, à l'aide des mêmes techniques, dans la corolle de narcisse (Kuhn 1970).

L'expérience de maturation à 30 °C, température inhibant la synthèse du lycopène, nous a permis d'induire, dans la partie externe du fruit, les seules inclusions globoïdes de β-carotène, donc le type de chromoplaste sphèrique habituellement caractèristique de la « pulpe ». Ainsi la répartition des deux types d'inclusions dont les structures et la spécificité pigmentaire semblaient pouvoir caractériser les deux régions du fruit, « pulpe » et « chair », n'est pas génétiquement déterminée. Elle parait dépendre d'un controle métabolique ou hormonal (Khudairi 1972), au contraire de la situation rencontrée chez de maïs, qui ne contient normalement pas de lycopène et où seule une mutation peut entrainer ce type d'accumulation, par perturbation d'une voie métabolique (Faludi-Daniel, Fridvalsky, Gyursan 1968, Walles 1971).

Nous avons grâce à cette étude, acquis la quasi certitude que les caroténoïdes néosynthétisés, n'ont pu être intégrés dans les membranes photosynthétiques remaniées et ont alors été accumulés, sous l'une ou l'autre des deux formes observées, à l'intérieur d'ex-thylacoides chloroplastiques. Dés les premières observations sur les chromoplastes, les discussions portaient sur les relations possibles entre l'apparition de leurs infrastructures (globules, cristaux ou filaments) et la lyse du matériel membranaire chloroplastique préexistant. Pour Steffen et Reck (1964) dans *Daucus carota* et pour Spurr et Harris (1969 b) sur un mutant de fruit de tomate de variété « Pearson » : les accumu-

lations de caroténoïdes ne se font pas au niveau des grana. Il semblait pourtant à ces deux derniers auteurs que, dans la tomate comme dans le *Capsicum* (Spurr et Harris 1968), il puisse y avoir réutilisation de matériel provenant de la lyse granaire, en un autre endroit du stroma, pour former les nouvelles accumulations observables dans les chromoplastes.

Un autre groupe d'auteurs notait une relation étroite entre les dépots intrachromoplastiques de nature cristalline ou semi-cristalline et du matériel membranaire : Rosso (1968) décrivait, dans le fruit de tomate, des lames cristallines qui lui semblaient être « des sacs aplatis, initiés en association étroite avec des membranes préexistantes du chloroplaste progéniteur ». Sur le même matériel Ben-Shaul et Naftali (1969) observaient l'apparition de membranes rigides spéciales en relation avec la formation des corps porteurs de lycopène. Enfin Harris et Spurr (1969 b), accordant là encore un rôle important à la partition, donnaient un modèle dans lequel le lycopène apparaissait en association avec les zones de partition, puis s'étendait d'un bout à l'autre de la surface externe du thylacoide.

Plus récemment Laborde et Spurr (1973) remarquent, dans certains *Capsicum*, des réarrangements de feuillets thylacoidiens à la périphérie des chromoplastes, la présence de thylacoides vésiculés et l'augmentation corrélative en nombre et en volume des globules osmiophiles ; ils situent comme Brooks et Stumpf (1966), les néosynthèses lipidiques au niveau du stroma et non des membranes thylacoidiennes.

L'utilisation de la technique du cryodécapage, qui permet le maintien *in situ* de la totalité des chromolipides présents dans les chromoplastes, nous a permis d'observer : que le lycopène néosynthétisé se dépose, à l'évidence, à l'intérieur des lumens de grands thylacoides, qui pourraient être des thylacoides intergranaires et qui, accroissant leurs dimensions, forment des édifices feuilletés aisément clivables. Ce mode de dépôts confirme nos observations antérieures (Laval-Martin 1969) qui situaient les dépôts semi-cristallins à l'intérieur de « couples membranaires ». Notre hypothèse sur l'origine des dépôts intrathylacoidiens est voisine de celle avancée par Kuhn (1970), dans son étude des chromoplastes de la corolle de narcisse, en cryodécapage.

L'accumulation de β-carotène sous forme de globules amorphes, semble se faire à l'intérieur d'ex-thylacoides granaires qui acquièrent une forme sphérique. Outre que ces globules de β-carotène présentent sur coupe un contraste souvent faible par rapport aux globules osmiophiles plus contrastés, qui sont de nature lipidique et riches en plastoquinones (Lichtenthaler et Tevini 1970 a, 1970 b) ; ils s'en distinguent surtout par l'existence, à leur périphérie, d'une membrane qui révèle par fracture une structure particulaire.

5. Conclusion

Dans les fruits de tomate « cerise », les chromoplastes dérivent de chromoplastes initialement bien différenciés et non d'amyloplastes comme ceux de

Daucus carota (Straus 1953, Steffen et Reck 1964, Ben-Shaul et Klein 1965, Frey-Wyssling et Schwegler 1965).

Lorsque les chloroplastes ont perdu environ 30% de leurs chlorophylles initiales, des transformations structurales s'opèrent, qui sont probablement sous controle métabolique ou hormonal. Les thylacoides les plus externes des grana se gonflent, comme s'il y avait modification de la perméabilité de la double enveloppe limitant le plaste ; d'autres thylacoides disparaissent. Dans la zone externe du fruit, la diminution du nombre de grana est contemporaine de l' apparition de très grands thylacoides, qui ne sont probablement pas néosynthétisés mais proviennent de remaniements de membranes préexistant dans le plaste ; nous n'avons toutefois pas observé, comme l'a fait Rosso (1968) un désempilement granaire et la mise bout à bout de ces thylacoides. La maturation se poursuivant, les teneurs en chlorophylles continuent de décroitre. Les chromoplastes de la zone interne du fruit accumulent surtout du β-carotène, tandis que ceux de la zone externe accumulent une même quantité de β-carotène et une quantité dix fois supérieure de lycopène. Les constituants fondamentaux des membranes photosynthétiques : phospholipides, galactolipides et protéines peuvent alors, même s'ils persistent (Straus 1956) perdre la possibilité d'intégrer dans les édifices structuraux qu'ils constituent, les nouvelles molécules de chromolipides. Ces dernières pourraient se trouver relachées dans les lumens des ex-thylacoides : les thylacoides granaires semblant accumuler préférentiellement le β-carotène et les thylacoides intergranaires, le lycopène. Si un tel mécanisme a lieu, il nécessite un schéma de lumen bordé d'une couche de molécules lipidiques hydrophobes (Menke 1963) et pouvant libérer enzymatiquement (Lehninger et Remmert 1959) ou non (Lichtenthaler 1969) des lipides préexistants ou néosynthétisés. Un tel modèle suggère un remaniement continu des membranes et permet de comprendre les images de réversion des chromoplastes en chloroplastes dans l'orange Valencia (Thomson 1967) ou dans *Daucus carota* (Grônegress 1971).

On peut d'autre part comparer les teneurs en pigments des plastes des deux zones du fruit et se souvenir que les pigments chlorophylliens et caroténoïdiens ont tous pour précurseur commum le géranyl — géranyl P-P, lui même dérivé du mévalonate. Durant la maturation, la « pulpe » perd environ 85 µg de chlorophylles et ne renferme plus finalement que 48 µg de caroténoides, surtout représentés par le β-carotène ; la « chair » perd environ la même quantité de chlorophylles mais accumule jusqu'à 245 µg de caroténoides dont 200 sont du lycopène. Ces chiffres permettent de penser que les plastes de la région interne du fruit subissent une sénescence sans synthèses actives. Les images des chromoplastes correspondant à cette zone rappellent d'ailleurs tout à fait celles des plastes d'organes sénescents (Lichtenthaler 1969, Młodzianowski et Kwintkiewicz 1973, Hernandez-Gil et Schaedle 1973), ou déficients (Hall, Barr, Abbas et Crane 1972). Pendant le même temps,

les plastes de la « chair » subissent un véritable bouleversement métabolique, avec arrêt de la synthèse des chlorophylles et déviation de l'utilisation des précurseurs commums aux deux types de pigments, vers la seule voie des synthèses caroténoïdiennes, pour un produit final : le lycopène.

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier Madame le Professeur Lefort-Tran et Monsieur le Professeur Ulrich, pour les conseils scientifiques qu'ils m'ont prodigués ; ainsi que Madame Pouphile pour ses directives techniques si nombreuses.

Bibliographie

Ben-Shaul, Y., and S. Klein, 1965: Development and structure of carotene bodies in carrot roots. Botan. Gaz. **126**, 79—85.

— H. T. Epstein, and J. A. Schiff, 1965: Studies of chloroplast development in *Euglena*, 10: The return of the chloroplast to proplastid condition during dark adaptation. Canad. J. Bot. **43**, 129—136.

— and Y. Naftali, 1969: The development and ultrastructure of lycopene bodies in chloroplasts of *Lycopersicum esculentum*. Protoplasma **67**, 333—336.

— T. Treffry, and S. Klein, 1968: Fine structure of carotene body development. J. Microscopie **7**, 265—274.

Brooks, J., and P. K. Stumpf, 1966: Fat metabolism in higher plants. XXIX. Properties of a soluble fatty acid synthesizing system from lettuce chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. **116**, 108—116.

Buvat, R., 1958: Nouvelles observations sur l'appareil de Golgi dans les cellules des végétaux vasculaires. C. R. Acad. Sci. **246**, 2157—2160.

— 1963: Electron microscopy of plant protoplasm. Int. Rev. Cytol. **14**, 41.

Delaporte, N., et D. Laval-Martin, 1971 a: Analyse spectrophotométrique des chlorophylles et des pheophytines *a* et *b* en milieu hydroacétonique. I. Détermination des extinctions molaires. Anal. Chim. Acta **55**, 415—424.

— 1971 b: Analyse spectrophotométrique des chlorophylles et des pheophytines *a* et *b* en milieu hydroacétonique. II. Méthode cinétique de dosage. Anal. Chim. Acta **55**, 425—435.

Deroche, M. E., 1969: Hétérogénéité des pigments liposolubles des chloroplastes de blé. Physiol. Vég. **7**, 335—389.

Duranton, J., et M. Lefort-Tran, 1968: Différenciation structurale et teneurs en protéines et en pigments chlorophylliens au cours du reverdissement chez *Zea mays* L. Bull. Soc. Franç. Physiol. Vég. **14**, 249—273.

Eilam, Y., and S. Klein, 1962: The effect of light intensity and sucrose feeding on the fine structure in chloroplast and in chlorophyll content of etiolated leaves. J. Cell Biol. **14**, 169—183.

Eyme, J., 1971: La structure des plastes dans les parenchymes des coupes receptaculaires florales du pêcher (*Prunus persica*) chez les variétés à chair blanche et à chair jaune. C. R. Acad. Sci. Paris **272**, 1232—1235.

Faludi, D. A., L. Fridvalsky, and I. Gyursan, 1968: Pigment composition and plastid structure in leaves of carotenoid mutants of maize. Planta **78**, 184—195.

Frey-Wyssling, A., und K. Mühlethaler, 1949: Über den Feinbau der Chlorophyll-Körner. Vierteljahresschr. Naturforschung. Ges. (Zürich) **94**, 179.

— und E. Kreutzer, 1958 a: Die submikroskopische Entwicklung der Chromoplasten in den Blüten von *Ranunculus repens*. Planta **51**, 104—114.

Frey-Wyssling, A., and K. Mühlethaler, 1958 b: The submicroscopic development of chromoplasts in the fruit of *Capsicum annuum* L. J. Ultrastruct. Res. **1**, 397—411.

— and F. Schwegler, 1965: Ultrastructure of the chromoplasts in the carrot root. J. Ultrastruct. Res. **13**, 543—558.

Gerola, F. M., F. Cristofori et G. Dassu, 1960 a: Ricerche sulle infrastrutture delle cellule del mesofillo fogliare di piante sane e virosate di tabacco (*Nicotiana tabacum*). A. Piante sane. Caryologia **13**, 352—366.

— 1960 b: Ricerche sulle infrastrutture delle cellule del mesofillo fogliare di piante sane e virosate di tabacco (*Nicotiana tabacum*). B. Piante virosate. Caryologia **13**, 367—378.

Goodenough, W. V., and L. A. Staehelin, 1971: Structural differentiation of stacked and unstacked chloroplast membranes (*Chlamydomonas reinhardii*). J. Cell. Biol. **48**, 594—619.

Grilli, M., 1965: Origine e sviluppo dei cromoplasti nei frutti di zucca americana (*Cucurbita pepo* L. *cv.* "small sugar"). II. Origine dei cromoplasti da cloroplasti e da proplastidi. Caryologia **18**, 435—459.

Grônegress, P., 1971: The greening of chromoplasts in *Daucus carota* L. Planta **98**, 274—278.

Hall, J. D., R. Barr, A. H. Abbas, and F. L. Crane, 1972: The ultrastructure of chloroplasts in mineral-deficient Maize-leaves. Plant Physiol. **50**, 404—409.

Harris, W. M., 1968: Chromoplast development in ripening tomato fruits, plastid ultrastructure in relation to carotene content of three pigment lines. Diss. Abstr. Sect. B **29**, 1274.

— 1970: Chromoplasts of tomato fruits. II. The high-delta tomato. Bot. Gaz. **131**, 163—166.

— and A. R. Spurr, 1969 a: Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. Amer. J. Bot. **56**, 380—389.

— 1969 b: Chromoplasts of tomato fruits. IV. Ultrastructure of low-pigment and high-β mutants. Carotene analyses. Amer. J. Bot. **56**, 369—374.

Heitz, E., 1936: Untersuchungen über den Bau der Plastiden. I. Die gerichteten Chlorophyllscheiben der Chloroplasten. Planta **26**, 134—163.

Hernandez-Gil, R., and M. Schaedle, 1973: Functional and structural changes in senescing *Populus deltoides* (Bartr.) chloroplasts. Plant Physiol. **51**, 245—249.

Khudairi, K. A., 1972: The ripening of tomatoes. A molecular ecological approach of the physiology of fruit ripening. Amer. Scientist **60**, 696—707.

Klein, S., and L. Bogorad, 1964: Fine structure changes in proplastids during photodestruction of pigments. J. Cell. Biol. **22**, 443—451.

Kuhn, H., 1970: Chemismus, Struktur und Entstehung der Carotinkriställchen in der Nebenkrone von *Narcissus poeticus* L. var. "La Riante". J. Ultrastruct. Res. **33**, 332—355.

Laborde, J. A., and A. R. Spurr, 1973: Chromoplast ultrastructure as affected by genes controlling grana retention and carotenoids in fruits of *Capsicum annuum*. Amer. J. Bot. **60**, 736—744.

Lance, A., 1958: Infrastructure des cellules du méristème apical et des jeunes ébauches foliaires de *Chrysanthemum segetum* L. Ann. Sci. Nat. Bot. et Biol. Veg. **19**, 165—202.

Lance-Nougarède, A., 1960: Développement inframicroscopique des chromoplastes au cours de l'ontogénèse des fleurs ligulées de *Chrysanthemum segetum*. C. R. Acad. Sci. (Paris) **250**, 173—175.

Laval-Martin, D., 1969: Evolution des pigments et des plastes au cours de la maturation de la tomate "cerise". Bull. Soc. Franç. Physiol. Veg. **15**, 77—97.

— J. Quennemet et R. Monéger, 1972: Sur l'évolution des caroténoides et des chlorophylles du fruit de tomate "cerise" pendant sa croissance et sa maturation. C. R. Acad. Sci. (Paris) **274**, 2879—2882.

Lefort-Tran, M., 1970: Discussion des techniques en vue de la conservation des pigments liposolubles en microscopie électronique. J. Micros. **9**, 881—890.

Lehninger, A. L., and L. F. Remmert, 1959: An endogenous uncoupling and swelling agent in lines mitochondria and its enzymic formation. J. biol. Chem. **234**, 2459—2464.

Lichtenthaler, H. K., 1969: Die Plastoglobuli von Spinat, ihre Größe und Zusammensetzung während der Chloroplastendegeneration. Protoplasma **68**, 315—326.

— 1970 a: Die Feinstruktur der Chromoplasten in plasmochromen Perigon-Blättern von *Tulipa*. Planta **93**, 143—151.

— 1970 b: Formation and function of plastoglobuli in plastids. 7° Cong. Intern. de Microsc. Elect. Grenoble **3**, 205—206.

— und M. Tevini, 1970: Die Verteilung der Pigmente, Plastidenchinone und Plastoglobuli auf verschiedene aus beschallten Spinatchloroplasten gewonnene Partikelfraktionen. Z. Pflanzenphysiol. **62**, 33—50.

Marty, D., 1973: Aspects particuliers de l'ontogénèse des thylacoides dans les feuilles panachées de *Coleus blumei* Benth. C. R. Acad. Sci. (Paris) **277**, 45—48.

Mazliak, P., et A.-M. Catesson, 1968: Métabolisme des lipides dans le parenchyme externe de l'épiderme des pommes. II. Evolution de la lipogénèse au cours de la croissance des fruits, relation avec la morphologie des plastes. Fruits **23**, 247—257.

Menke, W., 1963: Experiments made to elucidate the molecular structure of chloroplasts in photosynthetic mechanisms of green plants. Nat. Acad. Sci. natl. Res. Council Publ. **1145**, 537—544. Washington D.C.

Meyer, A., 1883: Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. Leipzig: Arthur Felix Verlag.

Mitchell, P., 1966: Chemiosmotic coupling in oxydative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev. **41**, 445—502.

Młodzianowski, F., and M. Kwintkiewicz, 1973: The inhibition of Kohlrabi chloroplast degeneration by kinetin. Protoplasma **76**, 211—226.

Monéger, R., 1968: Contribution à l'étude de l'influence exercée par la lumière sur la biosynthèse des caroténoïdes chez la *Spirodela polyrrhiza*. Physiol. Veg. **6**, 367—402.

Moor, H., 1964: Freeze-etching technique. J. appl. Phys. **35**, 3077.

— 1969: Freeze-etching. Int. Rev. Cytol. **25**, 391.

Murakami, S., 1964: Microstructure of chloroplast lamellae. J. Electron Microsc. **13**, 234—236.

— and P. S. Nobel, 1967: Lipids and light-dependent swelling of isolated spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. **8**, 657—671.

Reynolds, E., 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron-dense stain in electron microscopy. J. Cell Biol. **17**, 208—212.

Rosso, S. W., 1967: An ultrastructure study of the mature chromoplasts of the tangerine tomato (*Lycopersicon esculentum* var. "Golden jubilee"). J. Ultrastruct. Res. **20**, 179—189.

— 1968: The ultrastructure of chromoplast development in red tomatoes. J. Ultrastruct. Res. **25**, 307—322.

Savelli, R., 1937: Sur la distribution des caroténoides rouges dans les chromoplastes. Protoplasma **29**, 601.

Schimper, A. F. W., 1883: Über die Entstehung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. Bot. Z. **41**, 105—121, 137—153.

Schurmann, P., und W. Villiger, 1967: Veränderungen des Chlorophyllgehaltes und der Chloroplastenfeinstruktur in den Hochblättern von *Davidia involucrata* Baill. Planta **76**, 335—347.

Spurr, A. R., and W. M. Harris, 1968: Ultrastructure of chloroplasts and chromoplasts in *Capsicum annuum*. I. Thylakoid membrane changes during fruit ripening. Amer. J. Bot. **55**, 1210—1224.

Steffen, K., und G. Reck, 1964: Chromoplastenstudien. III. Die Chromoplastengenese und das Problem der Plastidenhüllen bei *Daucus carota*. Planta **60**, 627—648.

Straus, W., 1956: Isolation of chromoplasts from carrots. Exp. Cell. Res. **11**, 289—296.

Thomson, W. W., 1966: Ultrastructure development of chromoplasts in "Valencia" oranges. Bot. Gaz. **127**, 133—139.

— 1967: The reversion of chromoplasts to chloroplasts in "Valencia" oranges. Cytologia **32**, 117—124.

Toyama, S., 1967: Electron microscope studies on the morphogenesis of plastids. IV. Fine structure development of chromoplasts in the root of *Daucus carota*. The Science Report, Tokyo Kyoiku Daigaku B **12**, 188, 245—253.

Walles, B., 1971: Chromoplast development in a carotenoid mutant of Maize. Protoplasma **73**, 159—175.

Weier, T. E., and A. A. Benson, 1966: The molecular nature of chloroplast membranes. In: Biochemistry of chloroplasts, Vol. I, pp. 91—113 (T. W. Goodwin, ed.). London-New York: Academic Press.

Adresse de l'auteur : Dr. Danielle Laval-Martin, Laboratoire de Cytophysiologie de la Photosynthèse, C. N. R. S., F-91190 Gif sur Yvette, France.

Printed in Austria

grâce à l'expérience de maturation à 30°C. A cette température à laquelle la synthèse du lycopène est inhibée (BEN-SHAUL et NAFTALI, (8)), nous avons réussi à induire, dans la partie externe du fruit, les seules inclusions globoïdes à β - carotène, habituellement caractéristiques du tissu interne, au lieu des longs chromoplastes à aiguilles de lycopène. Ainsi avons nous établi une corrélation étroite entre la morphologie des chromoplastes dans les deux régions du fruit et la spécificité pigmentaire.

Afin de préciser et de tenter d'expliquer la dualité observée entre les deux régions du fruit quant à la répartition qualitative et quantitative des pigments dans le fruit mûr, et à l'organisation ultrastructurale des chromoplastes, nous avons cherché si des différences se manifestaient dans la composition biochimique du matériel membranaire plastidial (lipides et protéines) et dans les fonctions de ces organites.

Nous avons, dans les travaux ultérieurs, tenté de vérifier si la dualité observée entre les deux régions du fruit quant à la répartition des pigments et à l'organisation ultrastructurale des chromoplastes, s'accompagnait d'une dualité fonctionnelle et biochimique.

Nous avons, pour ce faire, analysé indépendamment la "pulpe" et la "chair" chez le fruit mûr et chez le fruit vert et avons introduit comme matériel témoin, la feuille verte adulte qui nous semblait constituer le chloroplaste de référence tel qu'il peut se différencier sous le contrôle du génotype de la Tomate cerise.

4. - COMPOSITION DES PLASTES

4.1 - Analyse des lipides

4.1.1. - Classes lipidiques

Abbréviations utilisées :

MGDG : monogalactosyldiglycérides
DGDG : digalactosyldiglycérides
TGDG : trigalactosyldiglycérides
LN : lipides neutres
PA : phospholipides acides
SG : stérolglucosides
PE : phosphatidyléthanolamine
PG : phosphatidylglycérol
PC : phosphatidylcholine
PI : phosphatidylinositol

Les lipides totaux extraits des membranes plastidiales isolées de la feuille et des deux régions de fruits verts et mûrs sont séparés par chromatographie (Fig.9).

Toutes les catégories lipidiques caractéristiques des chloroplastes de feuilles sont représentées dans les membranes plastidiales isolées à partir des chloroplastes ou des chromoplastes des deux régions du fruit, vert adulte ou mûr. On peut toutefois remarquer, que les plastes de fruit semblent très riches en lipides neutres qui se déplacent au front lors de la chromatographie et aussi en lipides assez polaires se retrouvant entre les trigalactosyldiglycérides (TGDG) et le phosphatidylinositol (PI) ; ces caractéristiques sont plus marquées dans le matériel isolé de la région interne du fruit. Nous n'avons pas cherché à identifier les divers lipides neutres ni à vérifier la présence éventuelle d'acides gras libres dans les extraits.

Dans les différents matériels analysés les galactolipides sont abondants (MGDG, DGDG, TGDG) ; tandis que le phosphatidylglycérol (PG) ne semble présent qu'en faible quantité dans le matériel membranaire plastidial du fruit.

La présence dans le matériel vert, ou la persistance dans le matériel mûr, des sulfolipides (SL) est difficile à détecter avec la méthode employée. Nos systèmes de solvants ne les séparent pas de la phosphatidylcholine (PC). Au stade vert comme au stade mûr, le phosphatidylglycérol (PG) n'est présent qu'en faible quantité.

Nous notons la persistance dans les chromoplastes du fruit des galactolipides reconnus spécifiques des chloroplastes (BENSON et coll. (9), LICHTENTHALER et PARK (77), TREMOLIERES (122)). En particulier les monogalactosyldiglycérides (MGDG) trouvés par KALRA (57) à tous les stades de maturation dans le péricarpe de la Tomate, mais jamais dans la fraction mitochondriale.

Des analyses quantitatives de la répartition des catégories lipidiques dans les diverses membranes plastidiales seront entreprises et comparées aux données déterminées par SITTE (112) dans des chromoplastes entiers isolés de la corolle du Narcisse.

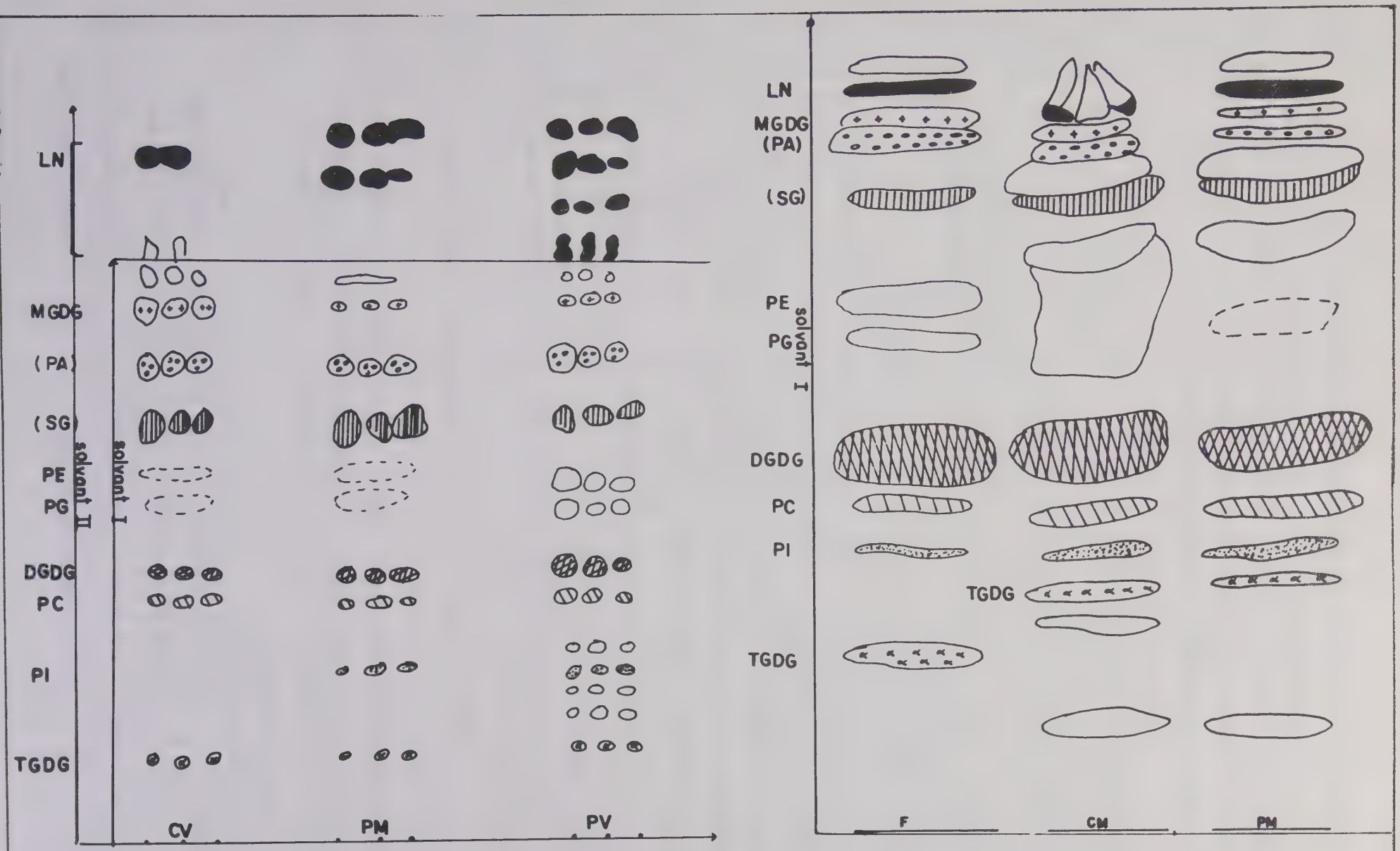


Figure 9 - Séparation en chromatographie sur couches minces des espèces lipidiques présentes dans la "chair" verte adulte (CV) ou mûre (CM) et dans la "pulpe" verte adulte (PV) ou mûre (PM), par référence au matériel foliaire (F).

4.1.2. - Analyse des acides gras totaux (Tableau II)

Le matériel membranaire chloroplastique est en général riche en $C_{16:0}$, qui est l'acide gras prépondérant, spécialement dans le cas de la feuille, et en $C_{18:3}$ qui représente dans les trois cas étudiés, 25 % des acides gras totaux des membranes vertes.

Les caractéristiques du matériel foliaire, par rapport au matériel provenant des fruits, sont une plus grande richesse en $C_{16:0}$, en $C_{16:1}\ \Delta^3$ trans et $C_{16:3}$; dans le fruit au contraire, on note des pourcentages élevés en $C_{18:1}$ et surtout $C_{18:2}$.

Si l'on compare les chloroplastes des deux régions du fruit entre eux on note que ceux de la "pulpe" sont respectivement 2,5 et 2 fois plus riches en $C_{16:1}\ \Delta^9$ cis et en $C_{18:1}$ que ceux de la "chair", dans lesquels on trouve par contre 2 fois plus de $C_{18:0}$.

On peut caractériser la maturation par la disparition du $C_{16:3}$, acide gras qui n'est pas présent dans tous les tissus verts et qui n'est abondant que dans les MGDG (COSTES et coll., (19)) ; par la diminution brutale, comme dans l'épiderme de la pomme (MAZLIAK et CATESSON (87)), du pourcentage de $C_{18:3}$, corrélative à l'augmentation du $C_{18:2}$ et du $C_{18:1}$ dans la "chair" et du $C_{16:0}$ dans la "pulpe".

Par contre, dans les chromoplastes, persiste l'acide hexadécénoique ($C_{16:1}\ \Delta^3$ trans) qui entre dans la composition du seul phosphatidylglycérol (HAVERKATE et VAN DYNEN (48)) reconnu comme spécifique des thylacoïdes photosynthétiques. On voit même cet acide gras s'accumuler dans la "chair" mûre.

Le fractionnement de divers chromoplastes nous a permis de recueillir :

- a) une fraction membranaire (PM_3), isolée à partir de chromoplastes de "pulpe", ne contenant pas de lycopène, mais enrichie en β-carotène (12 µg de ce pigment pour 100 µg de protéines, au lieu de 7,4 dans le

---

Abbréviations utilisées

$C_{16:0}$	: acide palmitique	$C_{18:0}$	: acide stéarique
$C_{16:1}\ \Delta^9$ cis	: acide palmitoléique	$C_{18:1}$	: acide oléique
$C_{16:1}\ \Delta^3$ trans	: acide trans Δ^3 héxadécénoique	$C_{18:2}$	: acide linoléique
$C_{16:3}$	: acide héxadécatriènoique	$C_{18:3}$	: acide linolénique

TABLEAU II - Répartition des acides gras, exprimée en % des acides gras totaux dans les membranes plastidiales isolées de la feuille et des deux tissus "chair" et "pulpe" de fruits verts et mûrs ; ainsi que dans deux fractions isolées de chromoplastes de "chair" et de "pulpe", enrichies respectivement en lycopène (CM_3) et en β-carotène (PM_3).

Acides gras / Type de matériel analysé	Pour cent des acides gras totaux									
	16:0	Δ^9 cis 16:1	Δ^3 trans 16:1	16:2 (?)	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3	chaînes > à 18:3
Chloroplastes de feuilles	42,9	1,4	7,5		3,9	5,8	4,3	9,4	24,8	
Chloroplastes de "chair" verte adulte	32,5	1,2	0,3		0,6	7,7	6,2	25,5	26,1	
Chromoplastes de "chair" mure	26,4	2,0	0,8	0,3		7,9	17,3	33,5	8,7	3,1
Fractions de chromoplastes enrichies en lycopène CM_3	32,6	1,8	0,7			4,5	8,3	40,9	11,2	
Chloroplastes de "pulpe" verte adulte	29,7	3,0	0,4		1,0	4,2	11,3	23,8	26,8	
Chromoplastes de "pulpe" mure	35,2	3,2	0,3	1,3		5,4	8,1	25,5	17,5	3,4
Fractions de chromoplastes enrichies en β - carotène PM_3	37,3	9,4				13,5	10,9	19,1	9,9	

matériel membranaire chromoplastique entier).

- b) une fraction membranaire (CM_3), isolée à partir de chromoplastes de "chair", enrichie en lycopène (23 µg de carotènes totaux pour 100 µg de protéines, au lieu de 17 dans le matériel chromoplastique entier, présentant un rapport lycopène / β - carotène égal à 6,5 au lieu de 6).

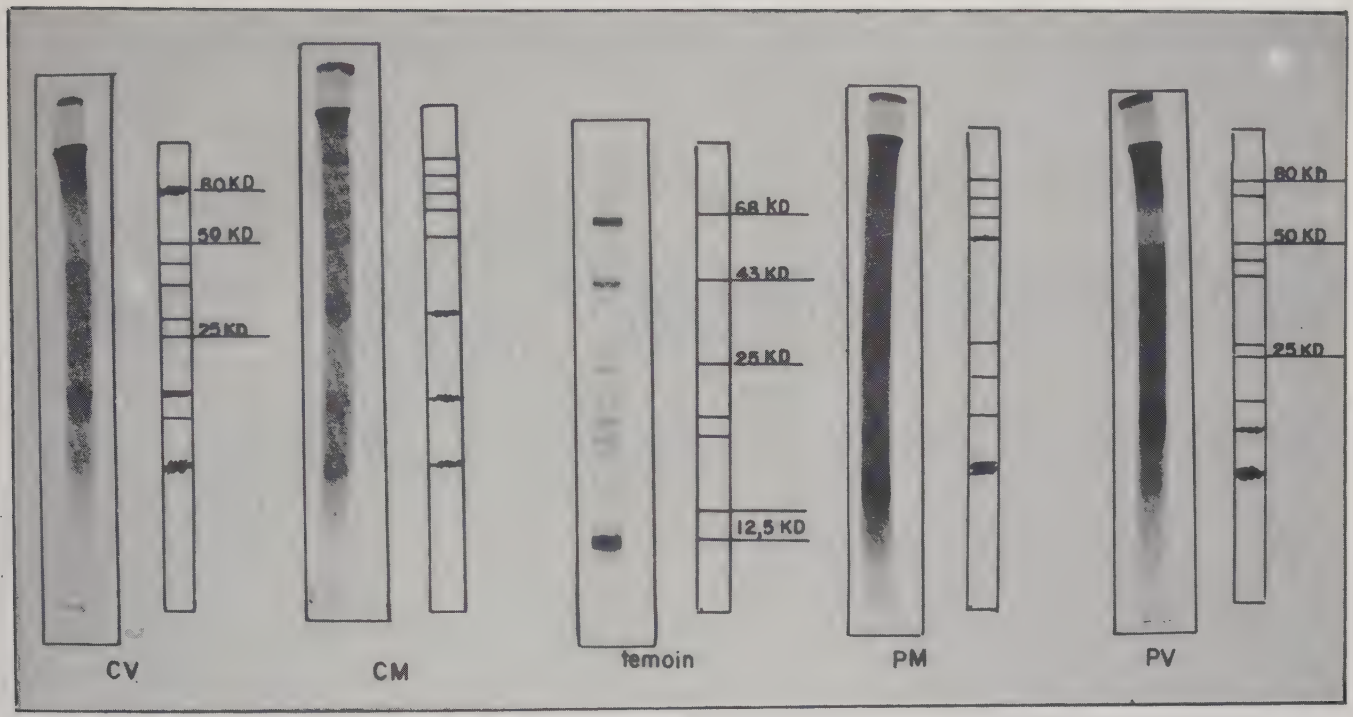
Les données du Tableau II montrent que les lipides associés aux accumulations de caroténoides sont, par comparaison avec le matériel chromoplastique total, en général enrichies en acide palmitique ($C_{16:0}$). Il est intéressant de remarquer que si le matériel plus spécifiquement associé au β - carotène est enrichi en $C_{16:1}\ \Delta^9$ cis, en $C_{18:1}$ et appauvri en $C_{18:2}$ et $C_{18:3}$; celui associé au lycopène est au contraire plus pauvre en $C_{18:0}$ et $C_{18:1}$ et plus riche en $C_{18:2}$ et $C_{18:3}$.

Nous devons noter que la valeur particulière du pourcentage de $C_{18:3}$ trouvée dans notre matériel foliaire, résulte du fait que nous avons analysé le seul matériel membranaire chloroplastique (fraction f_1, voir Matériel et Techniques). Une analyse, non rapportée dans ce mémoire, faite sur les lipides totaux du tissu entier de la feuille indiquait 40 % de ce même acide linolénique et seulement 20 % de $C_{16:0}$; de telles valeurs peuvent être plus aisément comparées aux données rapportées pour une autre espèce de Tomate (COSTES et coll., (19)) ou pour d'autres feuilles (NICHOLS et coll., (97), TREMOLIERES (123) et WALLACE et coll. (126)).

La maturation s'accompagne d'un appauvrissement en acide linolénique ($C_{18:3}$) pourtant caractéristique des galactosyldiglycérides, catégories lipidiques qui restent bien représentées dans les chromoplastes. L'analyse de l'évolution de la composition, en acide gras de ces galactosyldiglycérides apportera sans doute des résultats complémentaires intéressants.

4.2 - Analyse qualitative des protéines

L'examen des données de la Figure 10 et du Tableau récapitulatif III montre que certaines espèces polypeptidiques semblent communes aux trois types de matériel chloroplastique analysés: il s'agit de deux espèces de poids moléculaire de l'ordre de 15 et 20 KDaltons et de deux comprises entre 40 et 50 KDaltons. La "chair" présente une autre analogie avec la feuille : celle de 2 bandes présentes dans la région de



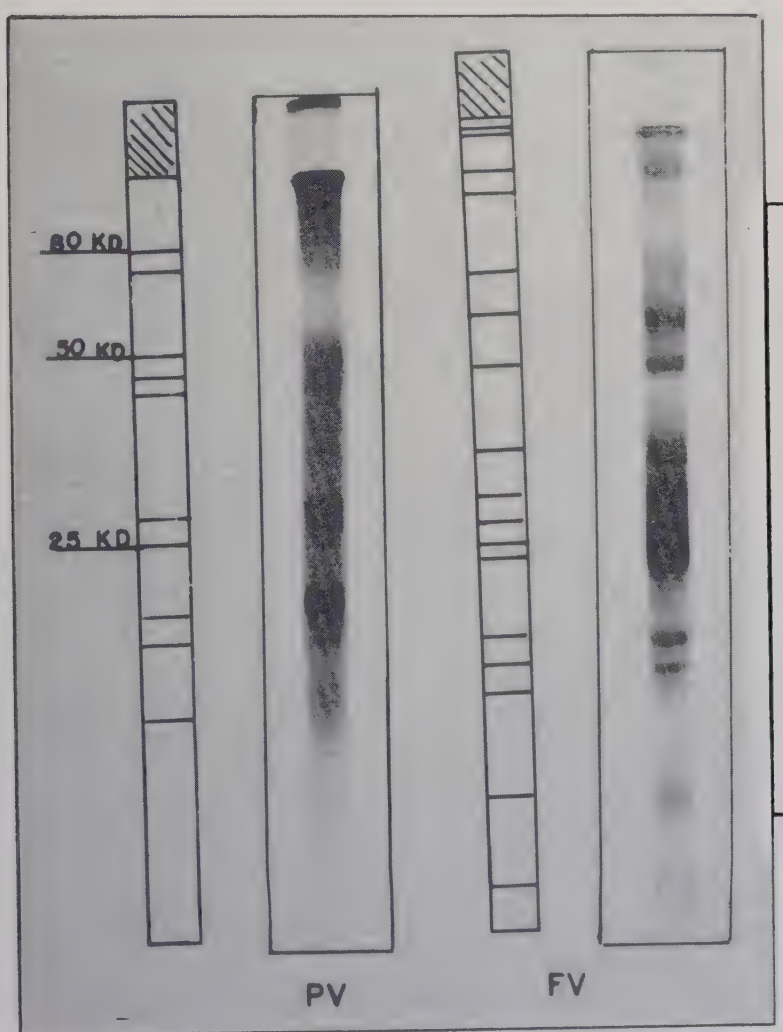


Figure 10 :

- Séparations électrophorétiques, sur gel de polyacrylamide, des polypeptides présents dans les membranes plastidiales isolées de la "chair" adulte verte (CV) ou mûre (CM), de la "pulpe" adulte verte (PV) ou mûre (PM) et de la feuille (FV). Comparaison avec un mélange de protéines témoins (témoin).

TABLEAU III - Détermination qualitative des espèces polypeptidiques présentes dans les membranes plastidiales isolées de la feuille, de la "chair" et de la "pulpe" de fruits verts (CV et PV) et mûrs (CM et PM). Résultats moyens de trois séparations électrophorétiques).

Comparaison des divers matériels.

Poids moléculaire en K Daltons \ Types de plastes	Chloroplastes de "feuilles" vertes	Chloroplastes de "chair" verte adulte	Chromoplastes de "chair" mûre	Chloroplastes de "pulpe" verte adulte	Chromoplastes de "pulpe" mûre	Chromoplastes du fruit "pulpe" ou "chair"	Chloroplastes du fruit "pulpe" ou "chair"	Chloroplastes de feuille ou de fruit
100	+				+			
90								
80		+	+	+	+	+	+	
75								
70			+	+	+	+		
65	+							
60			+		+	+		
55	+							
50		+	+	+	+	+	+	
40	+	+		+	+		+	+
			+					
	+	+		+	+		+	+
		+						
	+		+			+		
30	+			+	+			
25	+			+				
	+	+	+					
20	+	+		+	+	+	+	+
	+			+				
15	+	+		+	+		+	+
	+		+			+		
10	+		+		+	+		

30 à 40 KDaltons.

Toutefois, les analyses électrophorétiques révèlent un plus grand nombre de polypeptides dans les chloroplastes de feuilles (17 bandes), que dans les chloroplastes de fruits adultes verts (9 ou 10 bandes). Ils contiennent en particulier deux polypeptides de poids moléculaire compris entre 55 et 67 KDaltons, inexistants ou très faiblement représentés dans les chloroplastes extraits de fruits ; ils sont de plus riches en espèces de faible poids moléculaire (10 bandes environ comprises entre 30 et 10 KDaltons).

Les chloroplastes des deux zones du fruit vert adulte, se différencient de ceux de la feuille, par la présence de polypeptides particuliers de poids moléculaire élevé compris entre 50 et 80 KDaltons, ces espèces persistent et leur nombre semble s'accroitre au cours de la maturation. Dans les deux cas les chromoplastes présentent encore de nombreux polypeptides déjà présents dans le chloroplaste, en particulier les espèces de 53 et 80 KDaltons, celle de poids moléculaire peu différent de 22 KDaltons et peut-être également celle de 15 KDaltons. Par contre apparaissent trois nouvelles bandes à 63, 68 et 12 KDaltons, tandis que disparaissent les espèces à 43 et 49 KDaltons.

Au stade vert comme au stade mûr, les plastes de la "pulpe" semblent plus riches que ceux de la "chair" en espèces de petits poids moléculaires (inférieurs à 30 KDaltons).

Dans la "chair" nous n'avons pas pu caractériser précisément la bande de 25 ou 26 KDaltons présente à la fois dans la feuille et la "pulpe" ; bande qui disparait durant la maturation; on sait qu'elle est habituellement reconnue comme caractéristique de la présence d'empilements granaires et aussi d'un holochrome de la xanthophylle (LEVINE et coll., (76), KLEIN et VERNON (60), ANDERSON et LEVINE (1) et REMY (103)) et reliée pour certains auteurs au PS II.

Nous avons dans tous les cas mal distingué les 2 espèces à 62 et 66 KDaltons habituellement attribuées respectivement à une sous-unité du facteur de couplage et à un polypeptide situé entre l'accepteur primaire d'électrons du PS I et la ferrodoxine (MAC EVOY et LYNN (8), NELSON et coll. (95)).

Les polypeptides de 80 et de 53 KDaltons peuvent être considérés

comme des marqueurs de membranes des chloroplastes du fruit de Tomate, organites destinés à évoluer en chromoplastes, puisque ces espèces sont absentes de la feuille et qu'elles persistent dans le fruit mûr. Il est intéressant de rappeler que SITTE (112) a séparé des chromoplastes de la corolle de Narcisse, des espèces de poids moléculaire très voisins (62 et 80 KDaltons).

4.3 - Conclusion

La comparaison du matériel chloroplastique de fruit avec celui du chloroplaste de feuille pris comme référence, a montré que les plastes de fruit présentaient une faible variété d'espèces polypeptidiques, toutefois certaines étaient spécifiques du fruit (espèces de poids moléculaire compris entre 65 et 80 KDaltons) et persistaient jusqu'à la fin de la maturation.

Si les classes lipidiques sont qualitativement peu différentes entre les trois types de matériel étudiés, elles le sont probablement quantitativement puisque les répartitions des acides gras totaux diffèrent. Les membranes des plastes foliaires sont caractérisées par une grande richesse en acides gras à 16C (56 % dont 13 % sont insaturés), tandis que ceux du fruit le sont par une grande richesse en acides gras à 18C (65 % dont 60 % environ, surtout constitués des $C_{18:2}$ et $C_{18:3}$, sont insaturés).

De façon générale, il est plus aisé de distinguer la composition des membranes provenant de la feuille de celle des membranes provenant du fruit que de faire une distinction entre les compositions des membranes plastidiales, isolées de l'une ou l'autre des deux régions séparées du fruit.

Nous présentons un tableau (Tableau IV) montrant les compositions biochimiques, exprimées pour 100 µg de protéines membranaires, de deux fractions f_1 et f_2, pour chacun des trois types de chloroplastes étudiés. La fraction f_1 correspond au culot membranaire, de chloroplastes purifiés sur un premier gradient continu de saccharose, lavés puis cassés aux ultrasons et enfin soumis à une centrifugation poussée (voir Matériel). La fraction f_2 correspond à la bande de lamelles vertes que l'on peut isoler de la fraction précédente f_1, sur un second gradient semi continu de saccharose (voir Matériel, Tableau I et Fig 4 et 5).

L'examen des compositions des fractions f_1 révèle la richesse

TABLEAU IV - Composition biochimique du matériel membranaire chloroplastique de feuille, de "chair" et de "pulpe", rapportée à 100 µg de protéines membranaires plastidiales.

- f_1 correspond à la totalité du matériel membranaire de chloroplastes purifiés sur un premier gradient de saccharose,
- f_2 correspond à une fraction de lamelles vertes isolées à l'aide d'un second gradient de saccharose, à partir de f_1 cassée.

Type de matériel analysé / n.moles	Feuilles		"Chair" verte adulte		"Pulpe" verte adulte	
	f_1	f_2	f_1	f_2	f_1	f_2
Pigments :						
Chlorophylles	15,6	15,6	8,3	8,7	6,3	8,1
Chlorophylles / Carotènes	6,5		4,6		4,2	
Acides gras ($C_{16:0}$ à $C_{18:3}$)	36	12,2	88,7	69,8	62,3	66,9
Protéines / Chlorophylles	6,4	6,4	12	11,5	15,9	12,3
Acides gras / Chlorophylles	2,3	0,8	10,7	8,0	9,9	8,3

TABLEAU V - Composition en n.moles par fruit de divers constituants plastidiaux des tissus "chair" et "pulpe" de fruits verts et murs.

Type de plastes / n.moles	"Chair" verte	"Chair" mure	"Pulpe" verte	"Pulpe" mure
Protéines membranaires plastidiales	1087	1372	1567	678
Pigments :				
Chlorophylles	89		99	
Carotènes	17,4	484	21	100
Acides gras membranaires plastidiaux $C_{16:0}$ à $C_{18:0}$	96,5	128	99,0	94,6

deux fois plus grande en pigments chlorophylliens, des membranes photosynthétiques de la feuille par rapport à celles du fruit. Ces membranes sont par contre 2 à 2,5 fois moins riches en lipides que celles des tissus du fruit.

La comparaison entre les fractions f_1 et f_2 signale que les opérations de purification peuvent bouleverser les rapports Protéines/Chlorophylles ou Acides gras/Protéines. Nous reprendrons ce point dans le chapitre des Considérations Générales.

Au cours de la maturation, les membranes plastidiales subissent des remaniements lipidiques et protéiques, puisqu'on observe certaines variations tant dans la répartition des acides gras totaux que dans les profils électrophorétiques. Toutefois le matériel chromoplastique présente à la fois les catégories lipidiques caractéristiques du matériel chloroplastique (galactosyldiglycérides et surtout le phosphatidylglycérol caractérisé par l'acide Δ^3 trans hexadécénoique), et la moitié environ des espèces polypeptidiques présentes dans les chloroplastes du fruit vert.

Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse que nous avions formulée à partir de nos observations ultrastructurales : la maturation ne s'accompagne pas de la lyse totale des structures photosynthétiques : un matériel membranaire de type thylacoïdien persiste dans les chromoplastes.

Il semble même que les structures membranaires associées à une accumulation donnée de caroténoïdes puissent être caractérisées par une certaine distribution des acides gras. Une étude détaillée de la répartition quantitative des diverses classes de lipides et de polypeptides, à l'intérieur de diverses fractions plastidiales devrait pouvoir permettre de préciser encore certaines de nos observations ultrastructurales. Nous pourrions ainsi tenter de montrer que le β - carotène s'accumule préférentiellement dans les thylacoïdes granaires et le lycopène dans de grands thylacoïdes de type intergranaire.

Si nous extrapolons au fruit, par l'intermédiaire des données pigmentaires, les résultats qui précèdent, Tableau V ; nous pouvons remarquer que si la "chair" du fruit accumule du matériel membranaire plastidial, au cours de la maturation, et demeure très active, la "pulpe" au contraire s'appauvrit en matériel protéique et pigmentaire, tandis que

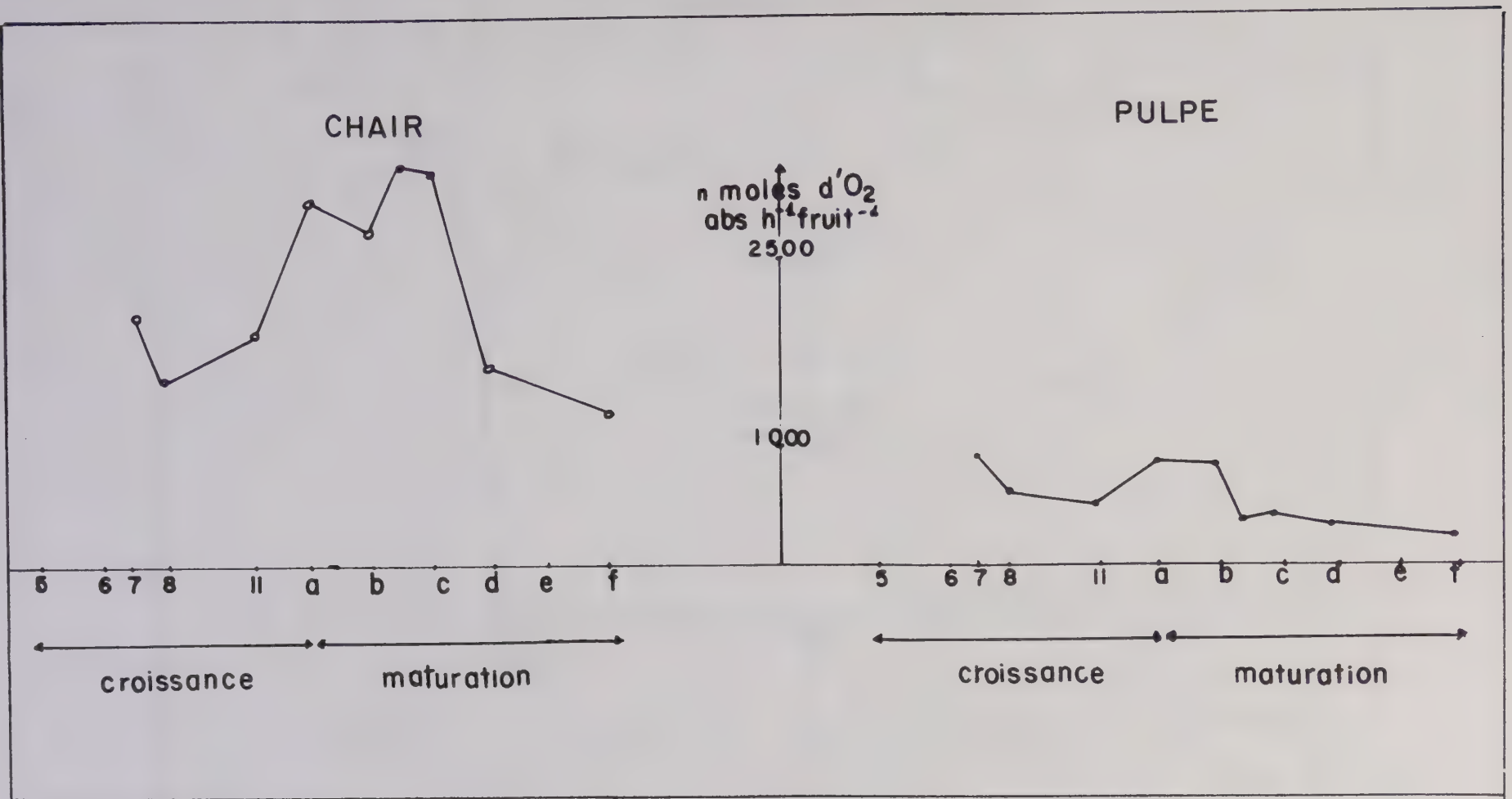


Figure 11 - Courbes représentant les intensités respiratoires moyennes, mesurées dans les deux types de tissu de fruits, récoltés à divers stades de leur croissance et de leur maturation (résultats moyens de cinq mesures).

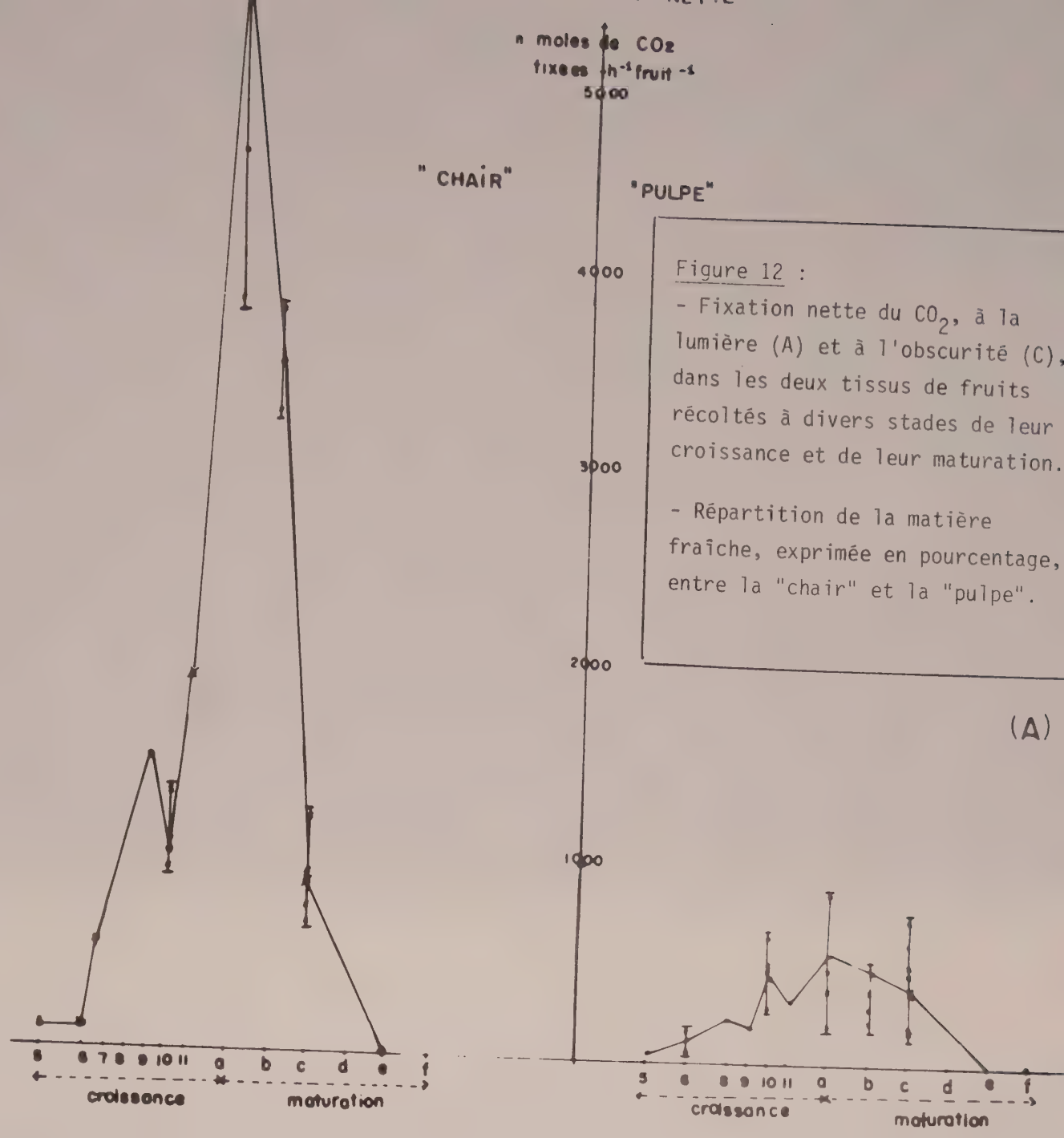


Figure 12 :

- Fixation nette du CO_2, à la lumière (A) et à l'obscurité (C), dans les deux tissus de fruits récoltés à divers stades de leur croissance et de leur maturation.

- Répartition de la matière fraîche, exprimée en pourcentage, entre la "chair" et la "pulpe".

le matériel lipidique y demeure pratiquement constant.

5. - ACTIVITES DES TISSUS

Nous rappelons que les mesures physiologiques ont été faites à partir de tissus excisés ; nous pouvons donc raisonnablement penser que nous avons analysé des potentialités optimales de tissus qui, *in situ*, pouvaient ne pas disposer des substrats par suite de leur pénétration plus ou moins difficile. Tous nos résultats ont été rapportés par fruit.

5.1 - Respiration (Fig. 11)

Quel que soit le tissu étudié, l'intensité respiratoire du jeune fruit est peu élevée jusqu'au stade 10 à 11 mm (qui correspond peut être à la fin de la multiplication cellulaire et au début de l'extension cellulaire. La respiration croit ensuite tant que le fruit vert n'a pas encore atteint sa taille maximale. Une "crise respiratoire", plus marquée dans la "chair" que dans la "pulpe", se manifeste durant la phase de transition, avec un maximum juste au moment ou le fruit commence à accumuler des quantités importantes de caroténoïdes. Il est intéressant de noter que les tissus de la "chair" du fruit, présentent toujours une intensité respiratoire 2,5 à 6 fois plus élevée, suivant les stades envisagés, que les tissus de la "pulpe".

5.2 - Assimilation nette de CO_2

5.2.1. - Fixation de CO_2 à l'obscurité

La fixation à l'obscurité de CO_2 (Fig. 12), présente, elle aussi, un maximum au stade vert adulte, elle diminue ensuite durant la phase de transition, puis augmente de nouveau. Si les deux courbes ont le même profil, les valeurs sont en moyenne 2 fois plus élevées dans la "chair" que dans la "pulpe".

5.2.2. - Fixation de CO_2 à la lumière

Les évolutions de la fixation nette du CO_2 à la lumière, dans chacune des deux régions du fruit sont parallèles. On observe (Fig. 12) là encore une intensité 2,5 à 8 fois plus grande dans la "chair" que dans la "pulpe". Ces régions ont cependant des teneurs en chlorophylles très comparables et même plus faibles dans la "chair" (Fig.3)

et des rapports Chlorophylle a/Chlorophylle b très peu différents.

5.3 - Conclusions

Les résultats précédents montrent des évolutions physiologiques à profils identiques dans les deux parties du fruit. Ils nous permettent de rejeter l'hypothèse d'un retard dans l'évolution de la zone interne par rapport à celle de la zone externe. Ils montrent de plus qu'aucun phénomène de compensation ne semble se manifester : ainsi, il n'y a pas, dans la "pulpe" qui fixe mal le CO_2 à la lumière, un renforcement de la fixation du CO_2 à l'obscurité.

Les mesures physiologiques effectuées ont, d'autre part, toujours indiqué une indépendance entre les activités du tissu externe et celle du tissu interne du fruit. La dualité observée entre ces deux tissus, tant au point de vue de leur évolution pigmentaire, qu'au point de vue de leur devenir structural, s'accompagne donc d'une dualité physiologique très marquée, illustrée par des potentialités métaboliques très inégales.

L'étude de la respiration a montré une crise respiratoire moins forte dans la "pulpe" que dans la "chair".

On peut rappeler ici que seuls les fruits classés (BIALE, (10)) parmi les espèces climactériques accumulent les caroténoïdes durant leur maturation. MARKS et coll. (84) puis SPENCER (114) ont fait la corrélation entre l'accumulation des caroténoïdes et les phosphorylations oxydatives et KUSHWAHA et coll., (63) ont montré l'intervention du NADPH + H^+ lors de la conversion du phytoène en phytofluène et celle du $FADH_2$ lors de la conversion du phytofluène en lycopène.

Ainsi à la faible quantité de pouvoir réducteur, disponible dans un tissu, qui respire peu comme la "pulpe", correspondrait une faible synthèse de caroténoïdes. Un tissu tel que la "chair", qui respire activement, serait par contre suffisamment pourvu en pouvoir réducteur pour que d'abondantes synthèses de caroténoïdes puissent avoir lieu.

La fixation de CO_2 à l'obscurité est relativement importante tout au long de l'évolution du fruit et le reste aux stades finaux de la maturation. On peut tenter d'expliquer ce fait en invoquant une augmentation d'activité de l'enzyme malique, comme dans la Pomme mature (CLIJSTERS (16)) ; ou encore une carboxylation de l'acétyl CoA en

malonyl CoA précurseurs des acides gras ou des restes isoprénoïdes (MAHLER et CORDES (82)).

Le fait le plus marquant de cette étude reste toutefois la mise en évidence de la très faible fixation nette de CO_2 à la lumière dans la zone interne excisée du fruit. Cette zone renferme pourtant des chloroplastes à ultrastructure classique et une importante quantité de chlorophylles (Fig. 3). Il apparait que dès le stade vert adulte, les chloroplastes qui évolueront plus tard, soit en chromoplastes globuleux à β - carotène, soit en chromoplastes allongés contenant de plus des cristaux de lycopène, présentent des caractéristiques fonctionnelles distinctives. Nous avons, dès lors, entrepris des analyses comparatives des compositions chimiques et des critères photosynthétiques des deux types de chloroplastes de fruit, par référence à des chloroplastes provenant de feuilles prélevées sur les mêmes plants.

6. - ACTIVITES PHOTOSYNTHETIQUES DU FRUIT PAR REFERENCE A CELLE DE LA FEUILLE

6.1 - Photosynthèse nette

6.1.1. - Fixation de CO_2. Efficacité photosynthétique

Si la concentration du milieu de réaction en bicarbonate de sodium n'est pas limitante, les réponses photosynthétiques des deux tissus du fruit en fonction de l'éclairement ont l'aspect représenté Fig.13 . Nous avons vérifié qu'à l'éclairement utilisé, 140 $W.m^{-2}$, nous nous situions également sur le plateau de saturation lumineuse du tissu foliaire.

Nous résumons Tableau VI les fixations nettes de CO_2 à la lumière des trois tissus étudiés.

La "chair" présente une intensité de carboxylation photosynthétique 20 fois plus basse que celle de la feuille, mais décuplée par rapport à celle de la "pulpe". Les mêmes résultats expérimentaux rapportés, non plus à l'unité de tissu frais, mais à l'unité de pigment chlorophyllien font apparaitre une efficacité photosynthétique tout à fait remarquable dans la "chair" (tissu pourtant tellement pauvre en chlorophylles) et quasi nulle dans la "pulpe'.

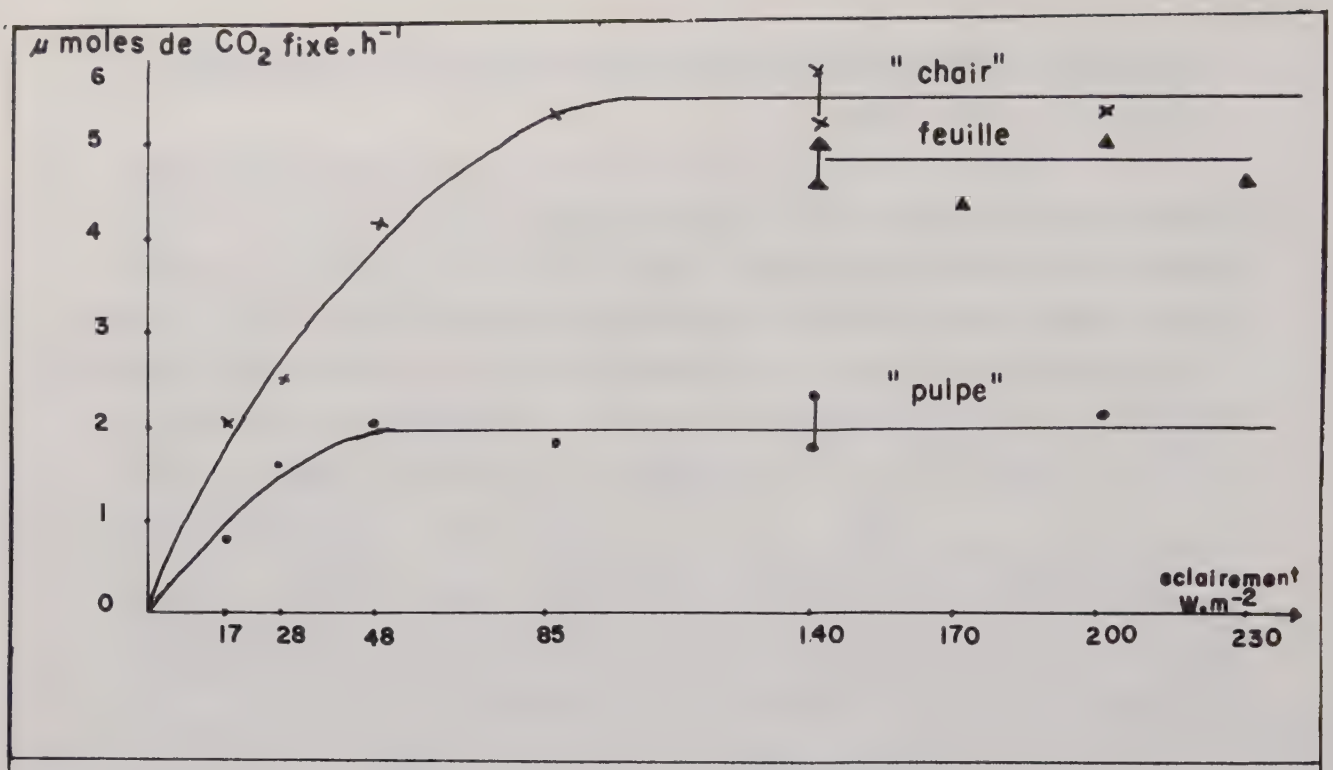


Figure 13 - Etude de la fixation nette de CO_2. Courbes de saturation lumineuse des tissus frais de "pulpe" et de "chair". Contrôle sur la feuille. Uniformisation à la demi "chair" (500 mg de tissu contenant 20 µg de chlorophylle), à la "pulpe" d'un fruit vert adulte (1300 mg de tissu contenant 130 µg de chlorophylle) et à 25 mg de feuille (soit 90 µg de chlorophylle).

TABLEAU VI - Assimilation nette du CO_2, à la lumière, mesurée in vivo sur la feuille, la "chair" et la "pulpe" vertes. (Résultats moyens de 5 mesures).

	Feuille verte adulte	"Chair" verte adulte	"Pulpe" verte adulte
Intensité photosynthétique : µ mole de CO_2 fixé par 100 mg frais et par heure	19,3	1,2	0,15
µg de chlorophylles rapporté à 100 mg de tissu frais	350	4,6	10,5
Efficacité photosynthétique : µ mole de CO_2 fixé par heure et par mg de chlorophylle	55,1	252	14,5

Si nous supposons d'une part que les tissus respirent de façon identique à la lumière et à l'obscurité, et d'autre part qu'il n'y a pas d'obstacle à la diffusion du bicarbonate dans les très petits fragments de tissu, si enfin nous négligeons la photorespiration que nous n'avions pas ici la possibilité de contrôler, les différences que nous observons entre les fixations de CO_2 à la lumière dans les trois types de tissus peuvent trouver une explication soit au niveau des mécanismes enzymatiques de fixation du CO_2 qui interviennent dans les étapes enzymatiques de la photosynthèse ; soit au niveau des mouvements d'électrons depuis l'eau jusqu'au $NADP^+$ ou encore de la fourniture des électrons par les centres PS II, ces derniers pouvant être plus ou moins nombreux par rapport à la chlorophylle présente. Nous envisagerons successivement ces différents points.

6.1.2. - Activités RuDP et PEP carboxylasiques

Le Tableau VII résume les résultats obtenus lors d'essais menés parallèlement sur un même extrait tissulaire. Nous observons d'importantes différences entre les activités enzymatiques permettant soit la fixation du CO_2 sur le RuDP, soit sur le PEP. Alors que le matériel foliaire présente une activité RuDPcarboxylasique 15 fois plus forte que l'activité PEPcarboxylasique, cette dernière activité étant peut être située au niveau de l'épiderme (WILLMER et coll., (129)) ; les tissus du fruit montrent une possibilité de fixation du CO_2 par la voie des intermédiaires en C-4, deux fois plus élevée dans la "chair" et 160 fois plus forte dans la "pulpe" que par la voie en C-3.

Ces deux types d'activités carboxylantes ne persistent qu'à l'état de traces dans le fruit mûr.

Ces résultats qui sont délicats à interpréter puisqu'on connait l'activité possible d'une PEPcarboxylase cytoplasmique $NADH_2$ dépendante, dans certaines voies reliant les intermédiaires de la séquence glycolytique et le cycle des acides tricarboxyliques (CONN et STUMPF, (17)), seront discutés ultérieurement.

Dans les deux types d'expériences (assimilation nette de CO_2 in vivo, en conditions de lumière saturante et carboxylation enzymatique in vitro) : l'efficacité photosynthétique des chlorophylles présentes dans la "chair" est plus élevée que celle de la feuille. Les résultats

TABLEAU VII - Activités de la RuDP carboxylase et de la PEP carboxylase dans des extraits cellulaires de feuille, de "chair" et de "pulpe" vertes. (Résultats de 3 tests enzymatiques).

µ moles de CO_2 fixées min^{-1} / Matériel	Feuille verte adulte	"Chair" verte adulte	"Pulpe" verte adulte
Sur le Ribulose 1,5 diphosphate :			
mg^{-1} de protéines solubles	0,119	0,027	0,000(4)
mg^{-1} de chlorophylle totale	2,05	2,48	0,060
Sur le Phosphoénol pyruvate :			
mg^{-1} de protéines solubles	0,007	0,058	0,018
mg^{-1} de chlorophylle totale	0,13	5,33	2,68
Activité RuDP Carboxylase / Activité PEP Carboxylase	15,7	0,46	0,02

TABLEAU VIII - Activités des photosystèmes I et II, mesurées sur des chloroplastes isolés de la feuille, de la "chair" et de la "pulpe" vertes. Mesures spectrophotométriques in vitro. (Résultats moyens de 5 mesures).

Accepteur réduit / Matériel	Feuille	"Chair" verte adulte	"Pulpe" verte adulte
Rouge de méthyle µ mole réduites.h^{-1} mg de chlorophylles^{-1}	20	34	29
DCPIP µ mole réduites.h^{-1} mg de chlorophylle^{-1} :			
sans DPC	1	10	20
avec DPC	15	15	24

L'éclairement saturant est de 93 $W.m^{-2}$.

relatifs à la "pulpe" sont par contre, beaucoup plus faibles in vivo qu'in vitro. On pourrait donc penser que la médiocre fixation nette du CO_2, mesurée in vivo dans ce tissu est due, non pas à une inactivité ou à une absence des enzymes fixatrices de CO_2, au cours des réactions enzymatiques de la photosynthèse, mais par exemple à une photorespiration intense (?) ou bien encore à une déficience au niveau de la photochimie.

6.2 - Photosynthèse partielle.

6.2.1. - Analyse des activités des photosystèmes I et II.

Puisque des étapes limitantes peuvent intervenir, in vivo, dans la succession normale des réactions d'oxydoréduction se déroulant lors du fonctionnement photosynthétique, il est intéressant d'isoler les unités PS I et PS II de la chaine de transfert des électrons de façon à pouvoir contrôler si ces centres sont potentiellement actifs in vitro en présence de donneurs et d'accepteurs exogènes d'électrons. De tels contrôles appliqués aux trois types de chloroplastes étudiés montrent (Tableau VIII) :

- la moins grande fragilité, puisqu'on observe un effet moindre du DPC, des intermédiaires dans le transfert d'électrons entre l'eau et le photosystème II, dans les chloroplastes isolés à partir des tissus de fruit, que dans ceux isolés à partir des tissus foliaires.

- la présence, dans les trois types de tissus, d'unités fonctionnelles PS I et PS II.

Les différences trouvées (Tableau VI) au niveau des fixations photosynthétiques nettes de CO_2, dans les trois tissus étudiés (et plus spécialement la très faible activité photosynthétique du tissu interne du fruit), ne semblent pas résulter d'une inactivité des centres PS I ou PS II. Il n'est toutefois pas possible d'exclure ni l'absence de certains intermédiaires dans la chaine de transporteurs d'électrons, ce que nous n'avons pas pu tester, ni une organisation différente des centres photosynthétiques sur les membranes rendant la photochimie peu efficace.

TABLEAU IX : Organisation et fonctionnement des unités photosystème II dans la feuille, la "chair" et la "pulpe" vertes. Analyse in vivo des cinétiques d'induction de fluorescence du PS II induite par un éclairement faible (40 $W.m^{-2}$).

- (1), (3), (4) - mesures sur les tissus entiers.
- (2), (5) - mesures sur des plastes isolés (5 µg de chlorophylle dans la cuve de mesure).

	"Feuilles"	"Chair"	"Pulpe"
(1) Forme de la courbe de montée de la fluorescence variable	Sigmoïde	Sigmoïde	Exponentielle
(2) Fluorescence totale ($mV.mg^{-1}$ de chlorophylle totale)	4 500	8 200	7 350
(3) $\frac{\text{Fluorescence variable}}{\text{Fluorescence constante}}$ ($\frac{FV}{FC}$)	1,8	1,2	0,3
(4) t 1/2 m.seconde	16	7,5	7,5
(5) Nombre de centres PS II en unités relatives	443	45	7
(6) Chlorophylles Photosystème I + II par centre PS II	12	5	42

6.2.2. - Cinétique d'induction de fluorescence du photosystème II.

Les résultats obtenus, sur les trois types de tissus verts étudiés, sont consignés dans le Tableau IX . On remarque, tout d'abord, ligne 1, que feuille et "chair" montrent des cinétiques sigmoïdes de montée de fluorescence variable, on doit en conclure que les unités PS II sont connectées (voir Méthodes). Au contraire la "pulpe" donne une réponse exponentielle indiquant l'impossibilité de transfert d'e^- entre ces unités. La comparaison des intensités de fluorescence totale, ligne 2, exprimées en mVolt par mg de chlorophylles totales, indique que la feuille est deux fois moins riche en chlorophylles impliquées dans le fonctionnement du PS II, que les tissus du fruit. Cette différence pourrait être attribuée, à l'abondance des chlorophylles système I dans le tissu.

L'examen des valeurs des rapports Fluorescence variable/Fluorescence constante (FV/FC), reflétant la proportion des chlorophylles du photosystème II efficaces dans la photosynthèse, indique une très active photochimie du PS II dans la feuille ainsi que dans la "chair". La valeur 0,3 de ce rapport trouvée dans la pulpe montre au contraire que la plupart des chlorophylles photosystème II sont inactives dans les centres d'ailleurs non connectés (réponse exponentielle).

Les valeurs des temps de demie montée, ligne 4, indiquent que les centres du photosystème II des tissus du fruit sont deux fois plus riches en molécules antennes associées que ceux des feuilles. Ces unités PS II seraient donc deux fois plus grandes dans le fruit que dans la feuille. La concentration relative de ces unités, sur les lamelles photosynthétiques, indiquée ligne 5 est respectivement 10 et 60 fois plus grande dans les tissus foliaires que dans ceux de la "chair" et de la "pulpe".

Enfin, les chiffres de la ligne 6, qui représentent les nombres relatifs de chlorophylles totales par unité PS II, montrent que chacune des unités photochimiques fonctionnelles PS II des chloroplastes de "chair" se rencontre pour un nombre de pigments chlorophylliens 2,5 fois plus petit que dans le cas des feuilles. La situation est bien différente pour les unités PS II de la "pulpe" qui sont associées à une quantité importante de chlorophylles totales.

Ces résultats qui seront repris lors de la Discussion, fournissent une des explications possibles des différences observées entre les efficacités photosynthétiques présentées Tableau VI.

6.3 - Conclusion

La traduction en intensités photosynthétiques (Tableau VI) des valeurs des assimilations nettes du CO_2 mesurées à la lumière pour chacun des tissus est bien sûr imprécise.

Nous n'avons en effet pas tenu compte de l'importance relative de divers phénomènes dont le principal, que nous n'avons pas pu contrôler est sans doute la photorespiration. Son intensité, dans les divers matériels, pourrait en effet modifier les valeurs trouvées puisque nous avons montré par ailleurs que les intensités respiratoires exprimées en µmoles d'O_2 absorbé par heure et par g. de matière fraîche sont différentes. Nous les avons trouvées respectivement égales à 0,38 dans la "pulpe", 1,63 dans la "chair" et à 3 dans la feuille. Ainsi les rapports moléculaires entre la quantité nette de CO_2 fixé à la lumière et l'absorption d'oxygène respiratoire mesurée à l'obscurité sont égaux à 1,2 dans la "pulpe", 3,5 dans la "chair" et 32 dans la feuille.

Nous pouvons toutefois faire un certain nombre de remarques sur les résultats donnés dans le Tableau VI. Elles concernent les corrélations entre la quantité de chlorophylles présentes dans un tissu et les capacités photosynthétiques de ce dernier :

- si le tissu de feuille, le plus riche en chlorophylle, présente l'intensité photosynthétique la plus élevée, le tissu de "pulpe" pourtant 2 fois plus riche en chlorophylle que celui de la "chair" est 10 fois moins actif que ce dernier pour la fixation du CO_2.
- si l'efficacité photosynthétique rapportée au g. de pigment chlorophyllien est la plus forte dans le tissu le plus dépourvu de ce pigment, elle est par contre la plus basse dans le tissu présentant la concentration intermédiaire en chlorophylles.

Ces remarques trouvent en partie leur explication au niveau des controles enzymatiques rapportés Tableau VII. En effet si les vitesses

d'incorporation du CO_2, exprimées pour un mg de chlorophylles, dans les intermédiaires du cycle de CALVIN sont, dans la feuille comme dans la "chair", tout à fait comparables à celles rapportées dans un autre matériel par KAGAWA et HATCH (56) ; la région externe du fruit présente de plus une fixation supplémentaire, deux fois plus intense, sur la PEP-carboxylase. Cette dernière enzyme est également active dans la "pulpe". Ces essais n'expliquent donc toujours pas pourquoi le niveau de fixation à la lumière du CO_2 dans ce tissu est si faible.

Ce dernier point ne devient compréhensible qu'à l'examen des résultats des essais portant sur les photosystèmes, si les centres PS I et PS II, excités par des radiations de longueur d'onde convenable sont dans les trois tissus envisagés capables d'effectuer le transfert des électrons depuis un donneur jusqu'à un accepteur exogènes (Tableau VIII). L'analyse détaillée des cinétiques d'induction de la fluorescence variable du photosystème II, en présence d'un découplant des transferts d'électrons entre les deux photosystèmes, indique (Tableau IX) que les unités PS II sont, dans la "pulpe" du fruit, peu nombreuses, constituées d'une grande quantité de chlorophylles non efficaces dans l'antenne et que le transfert des excitations de centre à centre s'effectue très mal.

Ainsi, la très faible activité photosynthétique de la "pulpe" s'expliquerait moins par une déficience enzymatique au niveau des réactions sombres de fixation du CO_2, que par une organisation très défavorable de ses unités photosystème II (et peut être aussi photosystème I) sur les membranes des thylacoïdes. La très forte efficacité photosynthétique dans la "chair" par rapport à celle dans la feuille s'expliquerait alors à la fois par une organisation très favorable des unités PS II sur les membranes des thylacoïdes et par la présence dans les tissus de deux enzymes carboxylantes actives : la RuDPcarboxylase et la PEP carboxylase. Il conviendrait de vérifier si l'activité de cette dernière enzyme est bien sous la dépendance de la quantité de $NADPH + H^+$ disponible.

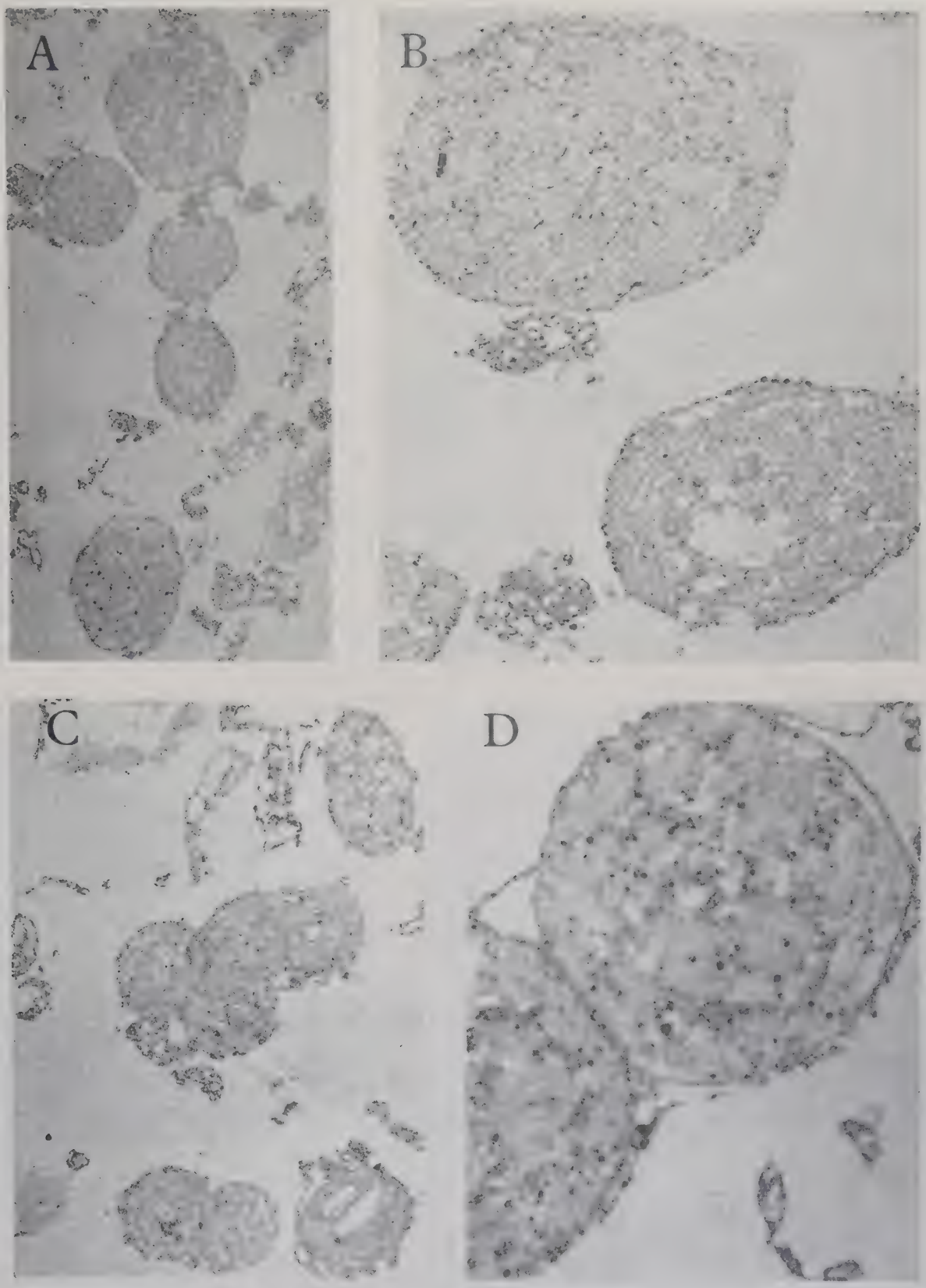
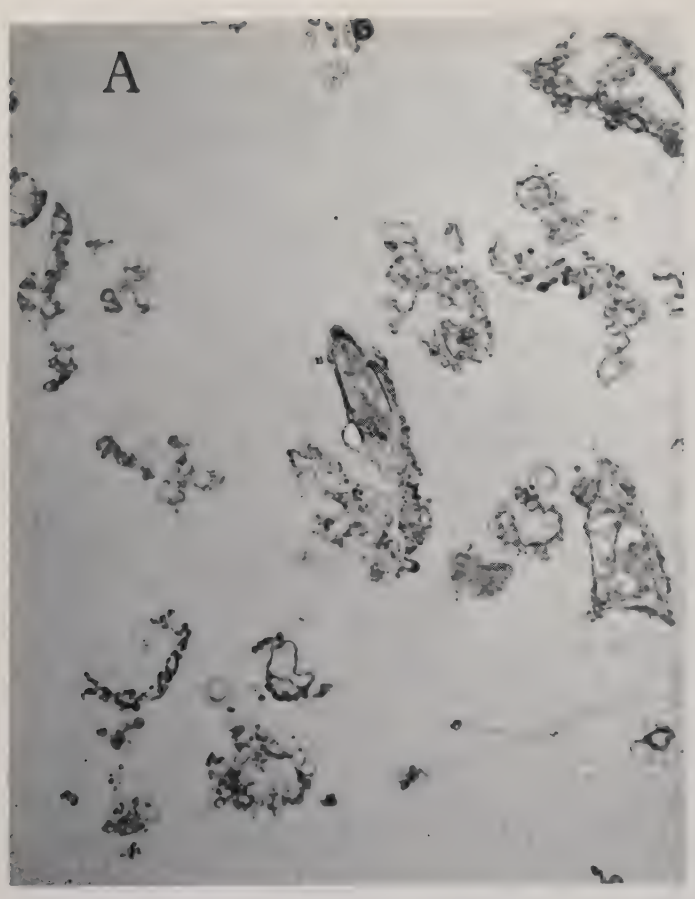
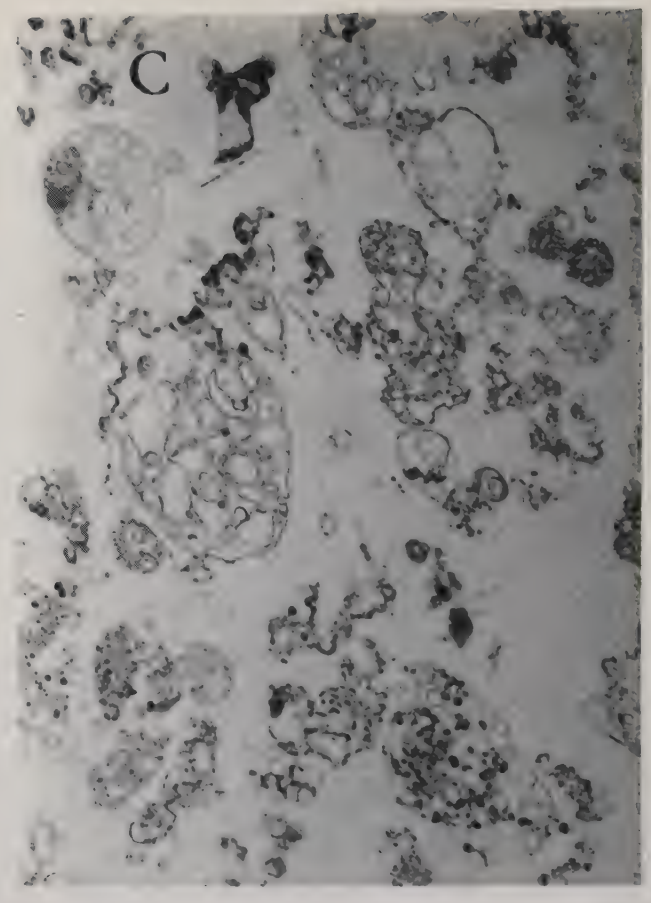
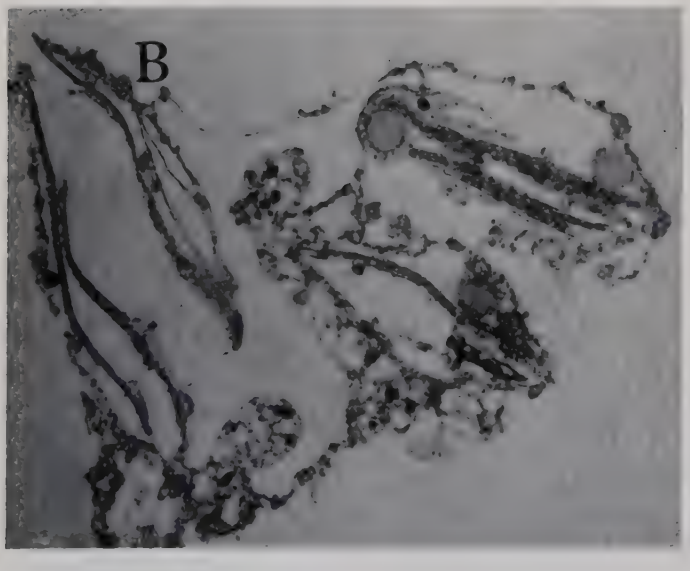


PLANCHE I : Aspect des fractions fi de chloroplastes, isolées à partir de fruits verts adultes .

A _ "chair" .x 14 000
B _ "chair" .x 37500
C _ " pulpe" .x 9 000
D _ " pulpe " .x 39000







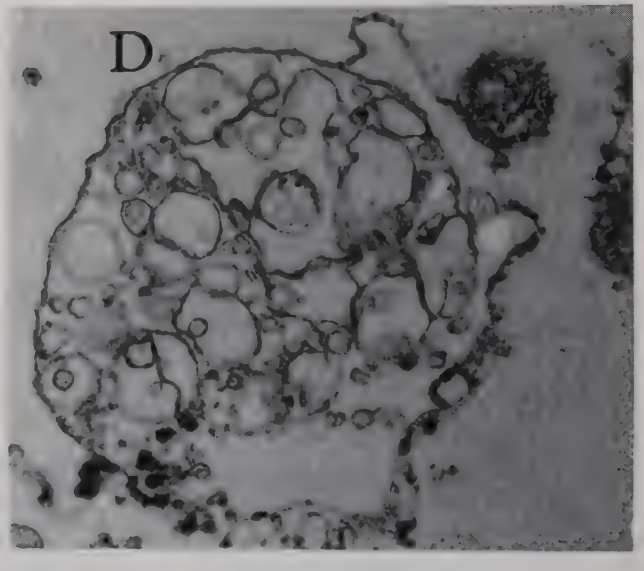


PLANCHE II : Aspect des fractions fi de chromoplastes, isolées à partir de fruits murs.

A _ "chair" .x 14500

B _ "chair" .x 34500

C _ "pulpe" .x 22500

D _ "pulpe" .x 46500

IV. CONSIDERATIONS GENERALES

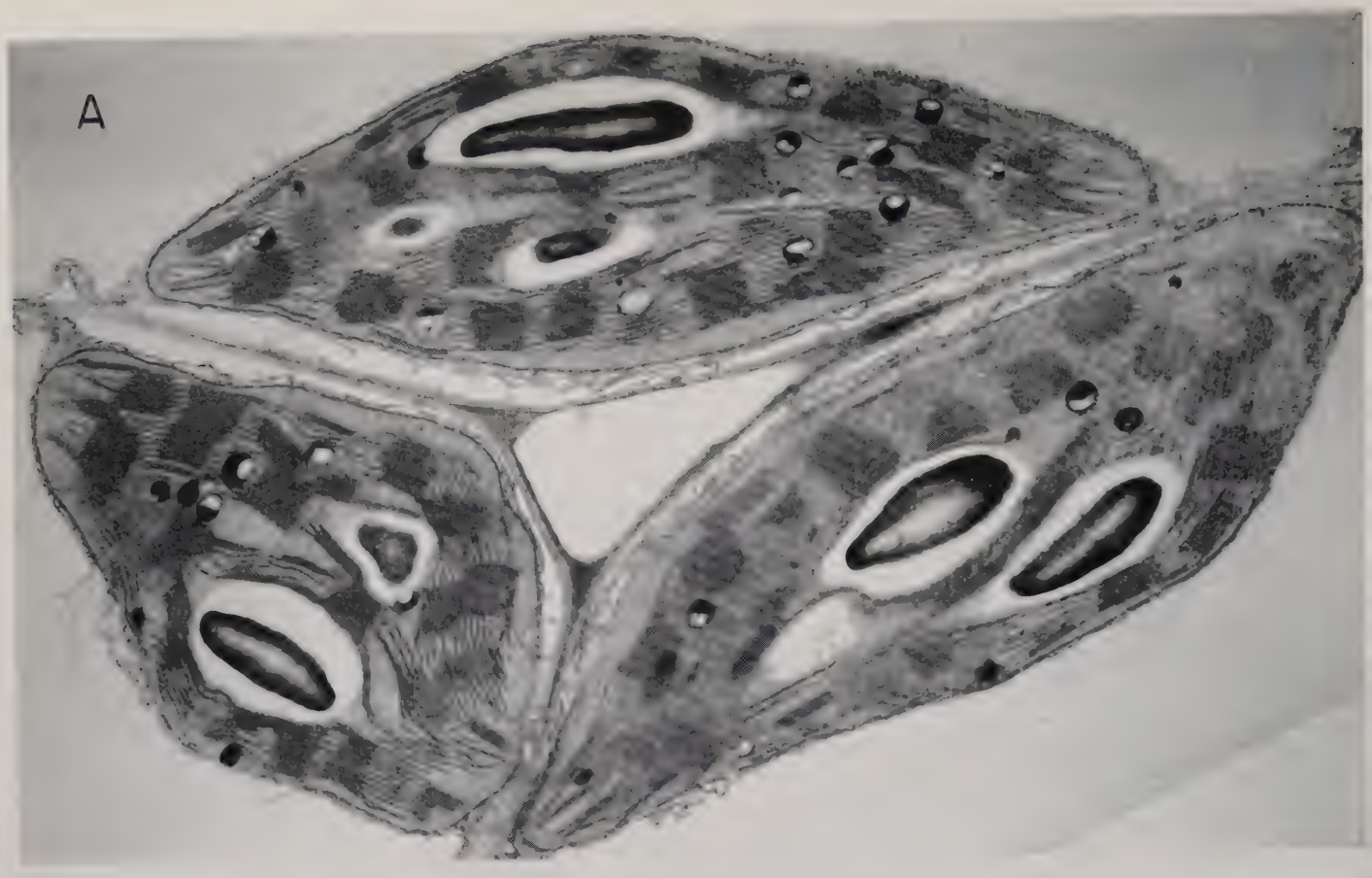
Dans l'ensemble des phénomènes liés à la maturation des fruits, nous nous sommes intéressée particulièrement aux séquences des événements métaboliques et structuraux, qui des chloroplastes du fruit vert adulte conduisent à la formation des chromoplastes dans le fruit mûr. Cette analyse nous a permis d'établir clairement, pour la première fois chez la Tomate, l'existence de deux types de chromoplastes, localisés dans deux régions différentes du fruit et caractérisés par des structures différentes, des inclusions de caroténoïdes différentes, enfin et surtout par une ontogénie différente.

En effet le dimorphisme chromoplastique que nous avons démontré n'est que la traduction, au moment de la maturation, d'une dualité qui existe initialement dans le fruit vert et que nos études photosynthétiques ont permis de mettre en évidence. Enfin il est apparu que si les chloroplastes du fruit forment deux catégories indépendantes : ils diffèrent moins entre eux qu'avec les chloroplastes foliaires auxquels nous les avons comparés. Ainsi le fruit mûr comme le fruit vert, ont ils constitué, au cours de notre étude, deux matériels biologiques d'une grande richesse dont la comparaison a permis une meilleure compréhension de deux états physiologiques d'un même organe qu'est le fruit.

1. - REMARQUES TECHNOLOGIQUES

Nous avons posé comme "postulat" que les pigments considérés (chlorophylle a et b, caroténoïdes et, parmi ces derniers, les pigments majeurs que sont le β-carotène, le phytofluène et le lycopène), sont exclusivement plastidiaux, ceci nous a toujours permis de rapporter nos résultats à l'unité biologique que constitue le fruit. Les contrôles en microscopie électronique nous permettent d'admettre que les fractions plastidiales isolées sont peu contaminées (Pl. I et II).

Les fruits sur lesquels ont été faites les diverses manipulations, quels que soient leur milieu de culture et leur date annuelle de récolte, étaient considérés comme identiques, à un même stade défini, soit par le diamètre, soit par la couleur ; ceci est confirmé par les analyses



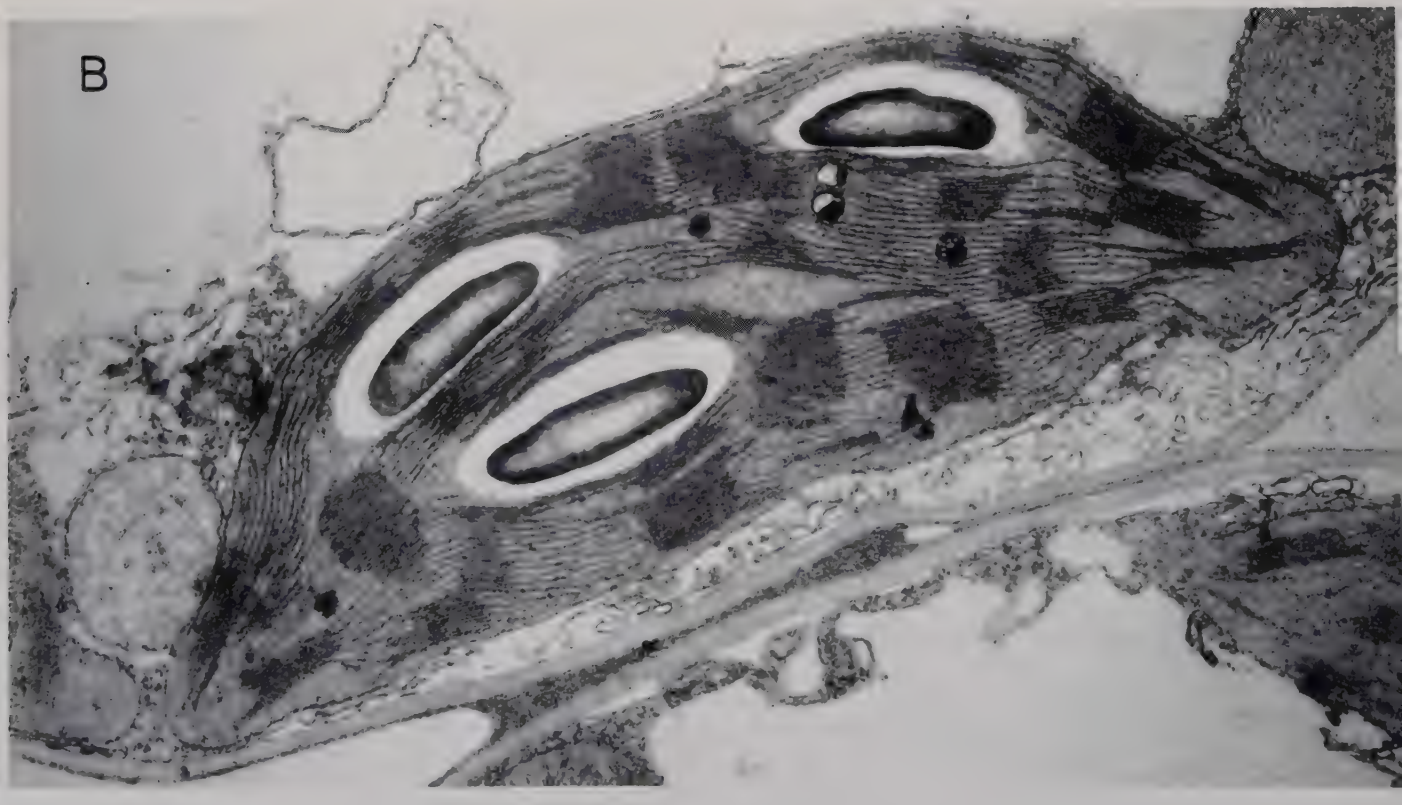


PLANCHE III : Chloroplastes du matériel foliaire témoin observés in situ.

A _ X 27000

B _ X 31 500

pigmentaires effectuées aux divers stades. Toutefois, pour plus de précision, les résultats que nous présentons sur les divers tableaux correspondent toujours à des manipulations effectuées parallèlement sur des tissus prélevés le même jour ou la même semaine, et soumis aux mêmes traitements. Nous admettons, enfin, avoir choisi, avec la feuille de dimensions moyennes 25/13 cm et de poids moyen 1,5 g, un témoin de référence satisfaisant (Pl. III). Nous cherchions en effet à comparer les chloroplastes d'organes verts adultes de la même plante, c'est à dire d'organes ayant terminé leur croissance et n'étant encore entrés ni en phase de maturation, ni en phase de sénescence. Nous ne perdons toutefois pas de vue que les caractéristiques tant biochimiques que fonctionnelles d'une jeune feuille en croissance sont probablement différentes.

Tout au long de notre étude nous avons rencontré la difficulté de trouver, pour tester les activités physiologiques ou enzymatiques, des conditions standard qui puissent être appliquées avec succès aux différents tissus étudiés et à différents stades de leur évolution. Il semble donc raisonnable de considérer nos résultats expérimentaux plus significatifs en valeur relative qu'en valeur absolue.

Le lecteur sera sans doute étonné de voir l'importance donnée aux résultats fonctionnels relatifs aux unités photosystème II, qui nous ont permis de proposer certains des modèles de membranes photosynthétiques et de ne pas trouver de tests équivalents pour l'étude des unités photosystème I. Nous pensons qu'un seul mode de ces analyses renseigne sur l'existence ou la non existence de différences au niveau de la photochimie dans les divers types de membranes étudiées, et c'est la réponse que nous cherchions.

Enfin la mise en évidence de ce que nous interprétons comme une tendance à la fixation du gaz carbonique, par la voie des intermédiaires en C_4, dans les tissus du fruit, plutôt que par le fonctionnement du Cycle de CALVIN, qui caractérise la photosynthèse dans les tissus foliaires ; requiert l'étude, par des méthodes chromatographiques, après des temps d'incorporation très courts (de l'ordre de quelques secondes), des intermédiaires marqués par le $^{14}CO_2$ fourni.

De tels contrôles qui nécessitent l'utilisation d'un substrat initial fortement marqué, compte tenu de l'intensité photosynthétique faible des tissus de fruit, n'ont jusqu'alors fourni que des résultats préliminaires que nous n'avons pas présentés ici.

2. - LA MATURATION ET LA TRANSFORMATION STRUCTURALE DES CHLOROPLASTES EN CHROMOPLASTES

La maturation est souvent contemporaine d'un changement de coloration du fruit, qui se traduit au niveau du chloroplaste par de profonds remaniements structuraux aboutissant généralement à une désorganisation membranaire et à des changements importants dans la composition pigmentaire.

2.1 - Chloroplastes

Le chloroplaste vert, outre le système complexe de thylacoïdes contient deux types principaux d'inclusions : l'amidon et les globules osmiophiles. Parmi ces derniers, présents dans la plupart des chloroplastes, on distingue les petits plastoglobules généralement situés aux extrémités des zones granaires et que les analyses ont révélé riches en plastoquinones (LICHTENTHALER et TEVINI (78)) et des globules plus volumineux à contraste électronique peu différent des précédants. Ces derniers, selon les tissus, peuvent être soit des sites de synthèses d'acides gras comme l'on démontré, dans l'endosperme de certaines graines, HARWOOD et Coll. (46), soit accumuler de la phytoferritine comme dans les chloroplastes de Cactées (THOMSON et PLATT (121)). Il est certain que ces globules, rares dans les chloroplastes des tissus normalement verts, deviennent abondants et volumineux lorsque des chloroplastes entrent en dégénérescence (LICHTLE (79)) ou lorsque des tissus sont carencés en substrats minéraux par exemple (HALL et Coll. (42)).

2.2 - Différents types de chromoplastes

Il semble bien que lors de la maturation de nombreux fruits : Orange (THOMSON (119)), Pomme (MAZLIAK et CATESSON (87)), mutants de Tomate (HARRIS et SPURR (44)) ; ou de l'évolution de certains organes floraux : pêcher (EYME (28)) ; l'accumulation de globules à contraste variable caractérise les chromoplastes définis alors comme chromoplastes globuleux. Pour la plupart de ces auteurs, il s'agit d'inclusions lipophiles de nature probablement caroténoïdienne. Nous avons montré que les globules observés dans la "pulpe" de Tomate sont constitués de

β-carotène. Les avis sont partagés quant aux relations entre ces condensations et le système membranaire chloroplastique : SPURR et HARRIS (115), bien qu'admettant la synthèse des globules au voisinage des membranes, ne donnent pas d'interprétation sur les interrelations possibles ; tandis que pour sa part, EYME (28) admet l'accumulation de certains pigments à l'intérieur des saccules granaires. C'est ce que nous croyons pouvoir aussi affirmer en ce qui concerne les chromoplastes de la partie interne de la Tomate. En effet, la possibilité de cryofracture d'une membrane unitaire pourvue d'une population de particules, la persistence d'un liseret opaque sur coupe après des déshydratations poussées et enfin l'aspect caractéristique de fragments membranaires en coloration négative, sur les fractions isolées de ces globules, accréditent l'idée que le β-carotène s'accumulerait à l'intérieur des lumens de thylacoïdes. Cette accumulation aurait lieu plus spécifiquement dans les disques granaires qui prendraient alors une configuration sphérique et se désaccoleraient des thylacoïdes voisins.

Un second type de chromoplaste est rencontré chez certains fruits comme le Capsicum. Dans ces organites décrits comme chromoplastes à structure fibrillaire ou filamenteuse par SPURR et HARRIS (115) ou LABORDE et SPURR (64), coexistent globules et fibrilles. Ces dernières inclusions qui n'existent pas dans les chromoplastes de la Tomate, semblent apparaître lorsque se désorganisent les grana.

Enfin un troisième type de chromoplaste à souvent été décrit, dans divers organes : la Carotte (STRAUSS (117)), la Corolle de Narcisse (KUHN (62)) et aussi dans la Tomate. Dans ces chromoplastes à cristaux, les auteurs s'interrogent également sur les relations possibles entre les accumulations cristalloïdes et le matériel membranaire. Si dans les chromoplastes de la Corolle de Narcisse, KUHN observe des restes de membranes unitaires le long des cristaux de β-carotène ; chez la Tomate, ROSSO (106) remarque des sacs aplatis, SPURR et HARRIS (115) tracent un modèle sur lequel le lycopène s'étale à la surface des thylacoïdes, BEN-SHAUL et NAFTALI (8) mentionnent des membranes denses adjacentes aux accumulations de lycopène. Si dès 1969 dans le tissu externe de la Tomate nous remarquions une association étroite entre les thylacoïdes et les cristaux, que nous signalions apparaître à l'intérieur du lumen des thylacoïdes ; les résultats tant structuraux que biochimiques de notre étude présente, montrent que les accumulations de lycopène se font à l'intérieur des lumens de grands thylacoïdes qui sont

peut-être de type intergranaire.

De telles accumulations cristallines de caroténoïdes peuvent être induites par des drogues dans des chromoplastes où elles n'existent habituellement pas ; c'est la cas des accumulations cristallines de lycopène apparaissant après un traitement au CPTA* dans les chromoplastes d'un Capsicum (SIMPSON and coll. (110)) ou d'un Cucurbita (FORTINO et SPLITTSTOESSER (31)) : ce pigment normalement absent des fruits apparait sous forme de cristaux dans des chromoplastes qui, à l'inverse des organites de Capsicum, sont alors dépourvus de capsaxanthine et de capsorubine et ne présentent alors pas de restes membranaires filamenteux.

MARZIANI et ORSENICO (85), puis WALLES (127) décrivent des grana géants qui apparaissent dans des mutants lycopéniques de maïs, et qui sont normalement absents de la souche sauvage. Par référence à ces travaux et par comparaison avec nos résultats sur la Tomate, il nous semble que l'on puisse admettre que, dans le cas du Capsicum traité au CPTA, les restes membranaires ont perdu leur aspect filamenteux, sans disparaître. Ils bordent alors les accumulations de lycopène ayant pris naissance dans leur lumen.

Nous avons donc mis en évidence, dans la "chair" de Tomate, des accumulations cristalloïdes de lycopène dans les lumens de grands thylacoïdes de type stromatique. Dans les chromoplastes de "pulpe" par contre le β-carotène, sous forme amorphe emplit les thylacoïdes de type granaire. Il n'est pas impensable d'invoquer une telle disjonction entre le type de thylacoïde et la nature biochimique du pigment accumulé dans le lumen, HENRIQUES et PARK (49) ont en effet montré que les deux types de membranes photosynthétiques, structures dynamiques avec renouvellement constant de leurs constituants, ont des centres de biosynthèses distincts.

Les désaccolements des thylacoïdes observés au début de la maturation, et qui se poursuivent pour donner les structures décrites, peuvent être la conséquence de changement de force ionique du stroma (GOODENOUGH et STAEHELIN (38)) pouvant induire des mouvements d'acides gras (MURAKAMI et NOBEL (94)) ou encore de la disparition des pigments chlorophylliens laissant en place le matériel membranaire lipoprotéique sous forme de vésicules (MENKE et coll. (88)).

---

* CPTA : 2-(4-chlorophenylthio) éthyldiethylammonium

La différenciation, dans le fruit de la Tomate, de deux types différents de chromoplastes, dans les deux régions différentes du fruit, nous semble être de nature plus ontogénique que phyllogénique ; en effet, notre expérience de maturation à 30°C a montré, que dans la zone où s'accumulent normalement globules de β-carotène et cristaux de lycopène, une haute température inhibant la synthèse de lycopène conduit à l'accumulation des seuls globules. Il est alors possible d'imaginer que la région interne du fruit soumise à une basse température pourrait accumuler des cristaux de lycopène. C'est donc peut être d'avantage la topologie du fruit et corrélativement la place occupée par le tissu étudié qui conditionnerait le devenir chromoplastique. Il ne s'agirait alors pas d'une prédétermination génétique. Suivant la forme du fruit et la localisation du tissu dans ce fruit, l'influence des facteurs externes serait plus ou moins grande, ainsi les échanges gazeux et l'éclairement pourraient-ils être limités.

La mise en évidence de la persistance d'un matériel membranaire bordant les deux types d'accumulations de caroténoïdes permet une meilleure compréhension des phénomènes de réversion de chromoplastes en chloroplastes ; de tels phénomènes ont en effet été décrits aussi bien dans des chromoplastes de type globuleux comme ceux de l'orange (THOMSON et coll. (120)) ou de la citrouille (DEVIDE et LJUBESIC (24)) que dans des chromoplastes à cristaux comme ceux de sépales (SITTE (112)) ou de carottes (GRONEGRESS (40)). Il est probable qu'une régression des pigments caroténoïdiens, au sein des restes membranaires les limitants, avec reformation des anciens thylacoïdes, ainsi que des synthèses de thylacoïdes nouveaux à partir d'invagination du feuillet interne de l'enveloppe (LEFORT (74)), se produisent simultanément. Les vacuoles à partir desquelles DEVIDE et LJUBESIC (24) voient se reformer des thylacoïdes nous apparaissent comme les vésicules membranaires visibles à l'emplacement des globules de caroténoïdes, quand ces derniers ont été vidés de leur contenu pigmentaire lors des déshydratations.

3. - LA MATURATION ET LES MODIFICATIONS PIGMENTAIRES

En même temps que s'opèrent les modifications ultrastructurales dont il vient d'être question, d'importantes transformations pigmentaires ont lieu. Le premier fait frappant est la chute brutale du contenu en pigments chlorophylliens. Ces pigments ne se résolvent d'ailleurs pas en dérivés tétrapyrroliques, mais sont dégradés en des

restes plus petits (DURAND et LAVAL-MARTIN (25)). C'est à ce moment que la structure granaire se désorganise réellement comme si un équilibre entre les quantités de chlorophylles et de caroténoïdes présentes dans les membranes était nécessaire pour que soit assurée la cohésion des arrangements granaires. Dès 1969 (LAVAL-MARTIN (69)) nous signalions que les désorganisations granaires devenaient importantes lorsque le rapport caroténoïdes/chlorophylles était passé de 0,65 à 2,25.

Les accumulations nouvelles de caroténoïdes apparaissent plus tard : elles sont diverses selon la nature des tissus ou leur localisation dans le fruit, comme c'est le cas dans la Tomate. Les deux phénomènes successifs, disparition des chlorophylles puis accumulation de caroténoïdes, dans des compartiments distincts et sous influence d'enzymes particuliers (PAPASTEPHANOU et Coll. (99)) ont été observés lors de la maturation de différents fruits (EILATI et Coll. (27) dans les agrumes : VALADON et MUMMERY (125) dans certaines baies). Leur enchainement a suggéré à RAMIREZ et TOMES (102) deux hypothèses sur les relations possibles entre les restes phytiques provenant de la dégradation des chlorophylles et les caroténoïdes ; ces deux classes pigmentaires ont en effet un précurseur commun le géranyl-géranyl pyrophosphate (COSTES (18)). La première des hypothèses suggère une réutilisation du phytol pour la synthèse des caroténoïdes nouveaux : elle n'est pas incompatible avec la situation dans la "pulpe" qui accumule en fin de maturation une quantité moléculaire de caroténoïdes environ moitié de celle des chlorophylles initialement présentes dans le tissu vert. Dans le cas particulier de la "chair" qui s'enrichit en une quantité très importante de lycopène et de son précurseur le phytofluène ; on devrait adopter, au moins partiellement, la seconde hypothèse. Selon celle-ci la voie biosynthétique menant aux caroténoïdes fonctionne de façon continue et la partie des métabolites initialement drainée vers la production du phytol se trouve disponible pour un renforcement de la synthèse des caroténoïdes. De telles corrélations étroites entre l'accumulation des caroténoïdes et la disparition des chlorophylles ont pu être induites par une déficience en ions K^+ (TRUDEL et OZBUN (124)), ou par le passage de l'autotrophie à l'hétérotrophie sur glucose d'une culture de Chlorella protothecoïdes (OSHIO et HASE (98)). Cette dernière observation est réversible par la lumière, même en présence d'un découplant entre les deux photosystèmes.

Les synthèses actives de caroténoïdes que nous avons mises en évidence, tout spécialement dans la partie externe du fruit, indiquent le caractère dynamique de la phase de maturation du fruit. MARKS and Coll. (84) ont d'ailleurs mis en évidence des processus de phosphorylation durant le déclin post-climactérique. La maturation des fruits, tout comme la sénescence des tissus foliaires, semble être sous dépendance hormonale ; on peut en effet les induire toutes deux par l'acide abscissique (MITTELHEUSER et Von STEVENICK (90), KUDAIRI (59)), alors que la kinétine inhibe la dégénérescence des chloroplastes de Kolharabi et l'acide gibberellique le changement de coloration des citrus (EILATI et Coll. (27)). Il y a donc dépendance étroite entre le devenir des plastes et les signaux venant du cytoplasme. CHOE et THIMANN (15) ont montré que des chloroplastes isolés de feuilles sénescentes restaient intacts plus longtemps in vitro, qu'in situ.

Durant la phase que nous avons définie, sur des critères pigmentaires, comme phase intermédiaire et qui se manifeste sur le plan structural par la désorganisation progressive de l'ordonnance granaire, interviennent des phénomènes actifs. Ce sont, la crise climactérique et l'émission d'éthylène (WORKMAN and PRATT (130)) contemporaine de la métamorphose pectique (KNEGT and Coll. (61)) et de l'enrichissement en composés phénoliques (FLEURIET et MACHEIX (30)). Après cette phase, les remaniements intervenus au sein du cytoplasme, comme ceux de nature protéique qui ont abouti à l'apparition de nouvelles activités enzymatiques (HOBSON,(50)), rendent irréversibles certains dommages antérieurement réparables (ROMANI and Coll.(104)). Il semble pourtant que jusqu' aux stades ultimes de la maturation, les plastes gardent une certaine intégralité génétique rendant possibles des transcriptions dans les cas d'éventuelles réversions. FALK et Coll. (29) ont en effet trouvé du DNA non dégénéré, sous forme circulaire, dans des chromoplastes de la corolle de Narcisse. Nos études ont d'autre part montré que les chromoplastes gardaient également une certaine intégralité de la composition biochimique de leur équipement membranaire. Nous avons en effet vu persister des espèces polypeptidiques et des catégories lipidiques caractéristiques des membranes des chloroplastes verts. Nous avons de plus, à l'inverse de NEWMANN (96) qui a analysé des chloroplastes sénescents, noté la persistence du $C_{18:2}$ en pourcentage élevé dans les chromoplastes

du fruit mûr et en particulier dans la fraction membranaire liée au lycopène (Tableau II). Nous repoussons donc l'analogie entre sénescence et maturation et définissons cette dernière comme un phénomène dynamique tout particulièrement dans la région externe du fruit dont les plastes sont capables de synthèses de caroténoïdes remarquables.

Nous avions mis en évidence une dualité structurale entre deux types de chromoplastes se développant, au cours de la maturation de la Tomate, dans deux régions différentes du fruit ; aussi nous sommes nous ultérieurement questionnée sur la préexistence possible d'une dualité au niveau des chloroplastes du fruit vert. Nos résultats tant structuraux que pigmentaires n'avaient montré aucune différence réelle entre les chloroplastes de la "chair" et de la "pulpe" ; nous avons donc approfondi notre étude et entrepris la comparaison des constituants biochimiques des membranes photosynthétiques des chloroplastes et des études fonctionnelles portant sur la photosynthèse. Nous avons à partir de ce moment, introduit comme témoin photosynthétique chloroplastique, les chloroplastes de la feuille adulte.

4. - LES CHLOROPLASTES DU FRUIT VERT

Les analyses biochimiques des trois types de chloroplastes ont révélé une grande ressemblance entre les deux types de chloroplastes du fruit. Ceux ci diffèrent sensiblement des chloroplastes de la feuille ; en particulier leur équipement polypeptidique membranaire est nettement moins varié que celui des chloroplastes foliaires et présente deux bandes caractéristiques des chloroplastes aptes à évoluer en chromoplastes. Nous avons en effet trouvé ces mêmes espèces dans les deux types de chromoplastes et SITTE (112) en avait signalé de voisines dans des chromoplastes isolés de la corolle du Narcisse. Toutes les catégories lipidiques caractéristiques des membranes des chloroplastes de feuille se retrouvent dans les chloroplastes des deux régions du fruit, mais sans doute en quantités relatives différentes puisque les membranes des chloroplastes du fruit se sont révélées, sur une même base commune de protéines, deux fois et demi plus riches en acides gras que les chloroplastes de feuille. Ces mêmes chloroplastes de fruit, très riches en lipides, étaient deux fois plus pauvres en pigments chlorophylliens, que ceux du matériel foliaire. C'est toutefois lors des analyses fonctionnelles que les différences les plus marquantes entre les trois types de chloroplastes sont apparues.

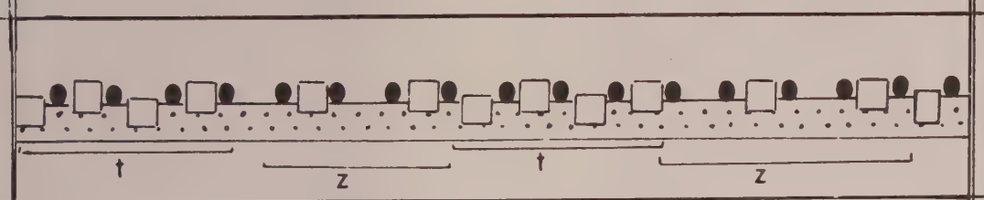
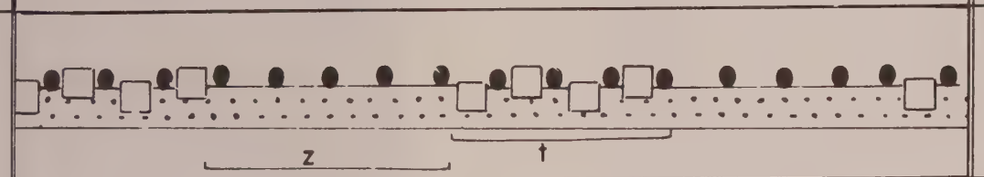
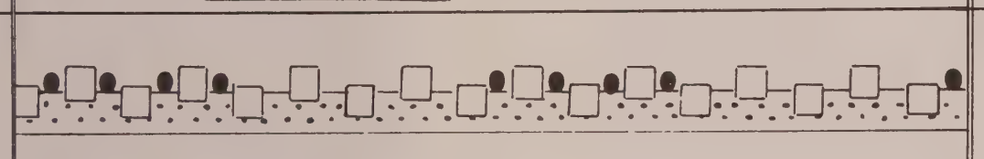
	Valeurs théoriques		FIGURE 14	Valeurs expérimentales		Matériel
	Protéines / Chlorophylles	Acides gras / Chlorophylles		Protéines / Chlorophylles	Acides gras / Chlorophylles	
Modèle a f_1	x_1	y_1				
Modèle a f_2	$x_2 = x_1$	$y_2 = y_1$				
Modèle b f_1	x_1	y_1		15,9	9,9	f_1 "PULPE"
Modèle b f_2 Zone t	$x_2 > x_1$	$y_2 \simeq y_1$				
Modèle b f_2 Zone z	$x_2 \ll x_1$	$y_2 \simeq y_1$		13,8	5,3	f_2
Modèle c f_1	x_1	y_1				
Modèle c f_2 Zone t	$x_2 \gg x_1$	$y_2 \simeq y_1$				
Modèle c f_2 Zone z	$x_2 = 0$	$y_2 = y_1$				
Modèle d f_1	x_1	y_1				
Modèle d f_2	$x_2 \lll x_1$	$y_2 \lll y_1$				
Modèle e f_1	x_1	y_1		12,0	10,7	f_1 "CHAIR"
Modèle e f_2	$x_2 < x_1$	$y_2 \ll y_1$		11,5	8,0	f_2
Modèle f f_1	x_1	y_1		6,4	2,3	f_1 FEUILLE
Modèle f f_2	$x_2 = x_1$	$y_2 \lll y_1$		6,4	0,8	f_2

TABLEAU X - Valeurs relatives des rapports $\frac{\text{protéines (ug)}}{\text{chlorophylles (n.moles)}} = x$ et $\frac{\text{acides gras (n.moles)}}{\text{chlorophylles (n.moles)}} = y$, du matériel membranaire total (f_1), soient x_1 et y_1 et de lamelles vertes (f_2), soient x_2 et y_2, isolées à partir de thylacoides ayant des structures correspondantes aux modèles a, b, c, d, e et f, proposés Figure 14.

Valeurs expérimentales de ces mêmes rapports, déterminées pour la feuille, la "chair" et la "pulpe", permettant l'adoption des modèles b pour la "pulpe", e pour la "chair" et f pour la feuille.

Figure 14 - Acides gras; Protéines; Chlorophylles.

4.1 - Modèles membranaires

Nos résultats tant biochimiques que fonctionnels nous permettent de proposer des modèles pour les trois types de membranes étudiées.

Si l'on tente de situer au niveau des thylacoïdes les trois constituants essentiels que nous avons analysés qui sont les protéines, les acides gras et les pigments chlorophylliens. Plusieurs modèles sont possibles qui sont représentés (Fig.14 et Tableau X). Nous avons noté, à gauche de chacun d'eux, les valeurs relatives des rapports protéines/chlorophylles et acides gras/protéines de fractions : f_1 correspondant au matériel membranaire total et f_2, correspondant à une fraction verte, purifiée sur un second gradient, après broyage aux ultrasons de f_1. A droite des schémas nous avons rappelé les valeurs expérimentales (Tableau IV) trouvées à partir de fractions f_1 et f_2 de feuille, "chair" ou "pulpe".

Nous envisageons six possibilités : dans les premières les chlorophylles sont disposées de façon homogène sur la couche lipidique. Dans le modèle a les protéines le sont aussi ; dans le modèle b, elles le sont de façon hétérogène ; et dans le modèle c, de façon encore plus hétérogène, de telle sorte que des zones lipidiques sont "libres" de toute protéine. Dans les autres modèles les chlorophylles sont arrangées de façon hétérogène sur la couche lipidique sur laquelle les protéines sont réparties soit de façon homogène, modèle d ; soit de façon hétérogène, modèle e ; soit de façon tellement hétérogène que des portions lipidiques sont là encore "libres", modèle f.

Parmi ces six schémas de thylacoïdes, nos résultats expérimentaux nous permettent d'adopter : le type f pour les thylacoïdes de feuille, le type e pour ceux de la "chair" et le type b (zone z) pour ceux de la "pulpe".

De telles interprétations de nos résultats sont sans doute critiquables, on peut en particulier dire que si les fractions f_2 sont réellement des fractions vertes de thylacoïdes, les fractions f_1 obtenues à partir des plastes par une seule purification sur gradient, étaient peut-être contaminées par des membranes microsomales ou mitochondriales.

Si tel était le cas, la fraction f_2 aurait logiquement due être appauvrie à la fois en protéines et en lipides, par exemple. Or, dans le cas de la feuille seuls les acides gras diminuent.

On pourrait aussi invoquer le fait que lors de l'analyse de la fraction totale de matériel plastidial f_1, des acides gras correspondant au pool des acides gras libres et non pas membranaires des chloroplastes pourraient être analysés. Cette hypothèse paraît devoir être écartée puisque les globules lipidiques libres du stroma, auraient dûs se retrouver non pas dans le culot de centrifugation avec les plastes cassés mais dans le surnageant.

Enfin il ne faut pas exclure une extraction possible de certains lipides membranaires au cours de la seconde séparation, sur gradient de saccharose, des plastes cassés aux ultrasons. Cependant le matériel plastidial provenant de la "pulpe" ou de la "chair", qui subit exactement le même traitement et qui est d'autre part remarquablement riche en acides gras, aurait dû lui aussi perdre des acides gras. Ce n'est absolument pas le cas puisque la fraction f_2 de "pulpe" se trouve même enrichie en acides gras par rapport à f_1.

Les trois types de chloroplastes que nous venons de définir quant à leur composition biochimique et à l'arrangement spatial de ces composés sur les membranes photosynthétiques, ont montré des capacités très différentes d'incorporation nette de CO_2 à la lumière. Puisque dans nos expériences, il ne nous a pas été possible de contrôler les intensités de photorespiration, nous faisons le choix de tenter une interprétation des résultats obtenus, qui ne mette en jeu que le fonctionnement de la photosynthèse.

Sur une même base de chlorophylle et par comparaison avec le matériel foliaire, la "chair" est 5 fois plus efficace photosynthétiquement, alors que la "pulpe" l'est 3 fois moins. Des études plus détaillées des réactions claires de la photosynthèse ont précisé que les différences entre ces trois types de tissus se situent au niveau de la répartition sur les membranes chloroplastiques des unités PS II et de la composition de ces unités en chlorophylles efficaces pour la photochimie.

Dans un tableau récapitulatif (Tableau XI), nous regroupons les résultats biochimiques du Tableau IV et les résultats fonctionnels du Tableau IX. Nous choisissons comme référence biochimique, une quantité

	Diverses caractéristiques des membranes photosynthétisues rapportées à 460 n.moles d'acides gras		
	Feuille	"Chair" verte adulte	"Pulpe" verte adulte
Chlorophylles totales (n.moles)	203	43,3	45,9
Protéines totales (µg)	1300	520	730
Nombre relatif d'unités PS II	16	8	1
Chlorophylles totales (n.moles), en quantités relatives, par unité PS II (chlorophylles syst. I, syst. II et inactives).	12,7	5,4	46
Fluorescence totale (mVolt, mg^{-1} de chlorophylle totale)	5500	7200	3000
Fluorescence constante (Pourcentage de la quantité de chlorophylle non associée au fonctionnement du PS II)	30 %	40 %	70 ou 80 %
$\frac{\text{Fluorescence variable}}{\text{Fluorescence constante}}$	1,8	1,2	0,3
Temps de demie montée de fluorescence variable (m.seconde).	15	7,5	7,5

TABLEAU XI - Tableau récapitulatif de données biochimiques et fonctionnelles présentées respectivement dans les Tableaux IV et IX.

d'acides gras, 460 n.moles, telle qu'on y rencontre (en quantité relative) au minimum une unité photosystème II sur le type de membrane où ces unités sont le moins fréquentes ("pulpe"). Les données du tableau ainsi obtenu permettent de préciser, d'un point de vue fonctionnel, les modèles f, e et b (Fig. 15) retenus respectivement pour les thylacoïdes de feuille, de "chair" et de "pulpe". Sur ce nouveau schéma (Fig. 15) les unités PS II ont été groupées par quatre, en accord avec les conceptions de JOLIOT and Coll. (54). Nous avons attribué à ces unités une surface proportionnelle à la taille de l'antenne (c'est à dire inversement proportionnelle au temps de demi montée de la fluorescence variable). Parmi les chlorophylles que nous y avons situées, nous avons distingué celles qui étaient actives dans l'antenne de celles qui ne l'étaient pas. Les quantités relatives de ces deux types de chlorophylles étant indiquées par la valeur du rapport fluorescence variable/fluorescence constante (lorsque ce rapport est élevé, c'est à dire lorsque les chlorophylles actives sont abondantes : l'efficacité de transfert des photons, de chlorophylle à chlorophylle, vers le centre actif, à l'intérieur d'une même antenne, est bonne). Nous représentons bien sûr des quantités relatives de chlorophylles par centre PS II ; les conceptions classiques mentionnent en effet la présence de 35 à 55 molécules de chlorophylle là où nous figurons 3 µ moles de ces pigments.

La grande quantité de chlorophylles totales par centre PS II de la feuille, corrélative à la faible richesse en chlorophylle photosystème II (donnée par un assez faible niveau de la fluorescence totale), suggère une forte proportion de chlorophylles impliquées dans le fonctionnement du photosystème I ; aussi sur le schéma correspondant au thylacoïde de la feuille, avons nous figuré de nombreuses chlorophylles à l'extérieur des unités PS II. Ces caractéristiques sont encore plus accentuées dans la "pulpe" où la répartition des chlorophylles sur la membrane est sans doute homogène (modèle b, Fig. 14).

Cette dernière représentation adoptée (Fig. 15) nous semble très bien illustrer pourquoi les transferts d'électrons entre unités PS II, qui sont possibles dans la feuille et dans la "chair", (montée de fluorescence variable sigmoïde), ne se font pas dans la "pulpe" (montée de fluorescence exponentielle). Selon ces derniers schémas, la représentation de sections transversales de membranes, (Fig. 15 B) soumises à

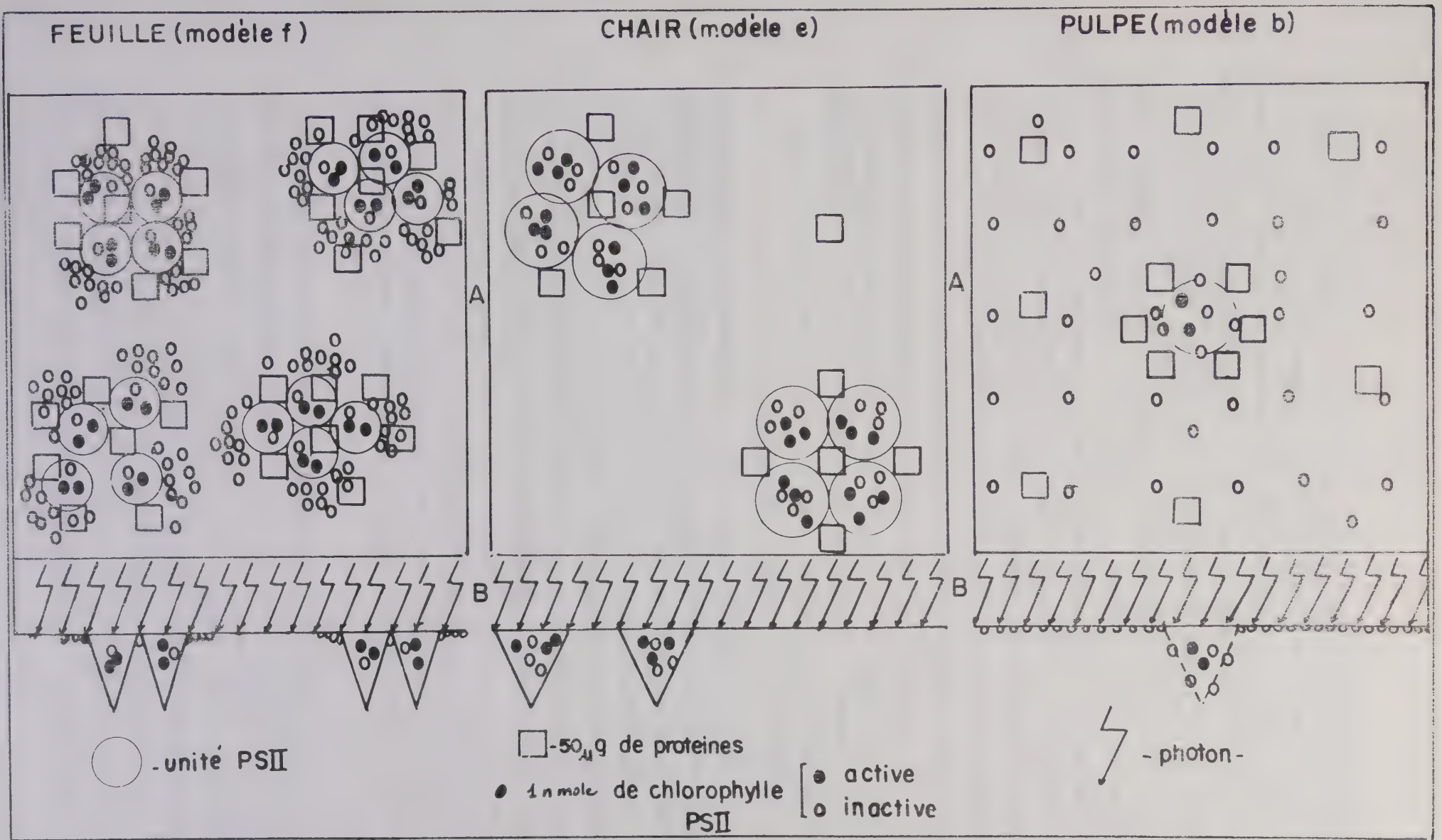


Figure 15 - A - Arrangement des protéines et des unités PS II, avec leur équipement chlorophyllien, sur les modèles f, e et b, adoptés respectivement pour les thylacoides de feuille, de "chair" et de "pulpe". Les quantités de chlorophylles et de centres PS II sont représentées en quantités relatives, pour une même surface lipidique de référence, qui correspont à 460 n.moles d'acides gras membranaires.

B - Coupes des modèles précédents, soumises à un même flux de photons.

un même éclairement (flux homogène de photons), suggère des intensités photosynthétiques par unité de surface membranaire comparables pour la feuille et pour la "chair" et très faible dans la "pulpe" ; elle rend plus difficilement compte d'une efficacité photosynthétique très élevée dans la "chair", moyenne dans la feuille et très basse dans la "pulpe".

Dans un nouveau tableau (Tableau XII) où nous reprenons cette fois les données biochimiques du Tableau IV et les caractéristiques de fixation nette de CO_2, mesurées in vivo, en lumière saturante (Tableau VI), nous rapportons le nombre des n.moles de CO_2 fixées par heure, respectivement à 1 n.mole de chlorophylle totale (ligne 1), à 100 µg de protéines membranaires (ligne 3) ou aux 460 n.moles d'acides gras membranaires, quantité ayant servi de base commune pour la schématisation (Fig. 15) (ligne 5). Les résultats ainsi exprimés, montrent que dans les deux tissus, feuille et "chair" (qui correspondent à des modèles où les arrangements des centres PS II sont favorables au fonctionnement photosynthétique), le facteur constant est la quantité de CO_2 fixé pour une quantité définie de lipides membranaires.

Afin de vérifier ce point, on peut remarquer, que puisque le rapport des quantités de chlorophylles correspondantes à 460 n.moles d'acides gras membranaires plastidiaux (ligne 4) dans la "chair" et dans la feuille est de 4,7 (203/43,3 = 4,7) : il faudrait 4,7 fois la quantité de lipides membranaires, associée à 1 mg de chlorophylle de feuille, pour obtenir 1 mg de chlorophylle de membrane plastidiale de "chair". Si la fixation photosynthétique de CO_2 est proportionnelle à la surface de la couche lipidique : la "chair" devrait alors être 4,7 fois plus efficace photosynthétiquement que la feuille ; or ce facteur 4,7, nous le retrouvons, effectivement, entre les deux efficacités photosynthétiques mesurées, in vivo, dans les deux tissus (280/61 = 4,6) (ligne 1).

Si on attribue à la couche lipidique ce rôle de support des autres constituants (SINGER (111)) on peut dire que la quantité de CO_2 fixée photosynthétiquement est constante par unité de surface thylacoïdienne. Dans ce cas il semble logique d'admettre que puisque les fixations de CO_2 par unité de surface de thylacoïde sont égales, dans la "chair" qui comporte un nombre limité de centres actifs et peu de chloro-

	Feuilles	"Chair" verte adulte	"Pulpe" verte adulte
(1) Fixation photosynthétique de CO_2, in vivo, (Tableau IX) traduite en n.moles fixées h^{-1} . $n.mole^{-1}$ de chlorophylles totales.	61	280	16
(2) Quantité de chlorophylles totales pour 100 n.moles de protéines membranaires plastidiales. (Tableau VIII)	15,6	8,3	6,3
(3) n.moles de CO_2 fixées pour 100 n.moles de protéines membranaires plastidiales et par heure = (1) x (2)	770	1860	75
(4) Quantité de chlorophylles totales (n.moles) pour 460 n.moles d'acides gras membranaires plastidiaux. (Tableau XI)	203	43,3	45,9
(5) CO_2 fixé photosynthétiquement par 460 n.moles d'acides gras membranaires plastidiaux = (1) x (4)	12380	12124	734
(6) Nombre relatif de centres PS II sur une même surface lipidique de membrane plastidiale. (Tableau XI)	16	8	1
(7) CO_2 fixé photosynthétiquement par unité PS II (en valeur relative.	773	1515	734

TABLEAU XII - Caractéristiques de fixation lumineuse globale de CO_2, rapportées aux divers constituants biochimiques analysés.

phylles et dans la feuille, au contraire très riche en centres actifs et en chlorophylles ; la fixation de CO_2 photosynthétique est donc probablement limitée dans la feuille au niveau des réactions sombres. Comme semble l'admettre la plupart des auteurs les molécules de RuDP carboxylase se trouvent disposées à la surface des thylacoïdes et attachées par une liaison faible puisque de simples lavages permettent de les en détacher (ARNTZEN and Coll. (4)). Il se pourrait donc, qu'à une surface donnée de membrane, ne puisse correspondre qu'une quantité donnée de ces enzymes sous forme fonctionnelle, ne pouvant utiliser qu'une même quantité de pouvoir réducteur. Dans le cas de la feuille la photosynthèse globale serait alors limitée par un pool d'enzymes, ni assez important, ni assez actif pour pouvoir utiliser tous les actes photochimiques rendus possibles par l'arrangement très favorable des centres photochimiques sur les thylacoïdes. Il est également possible d'invoquer des limitations par suite de la saturation des systèmes de couplage entre les deux photosystèmes, sur ce type de membrane .

Dans le cas de la "chair", les étapes limitantes qui peuvent se manifester soit au niveau des réactions sombres, soit au niveau des couplages semblent beaucoup moins importantes et la photochimie semble être utilisée avec un meilleur rendement pour la photosynthèse. On rappelle d'ailleurs que pour ce type de tissu la maximum de consommation de CO_2, exprimée par unité de pigment chlorophyllien, se trouve situé vers les fortes intensités lumineuses ; c'est à dire que les flux d'électrons semblent y être plus rapides.

Dans le cas de la "pulpe" : la quantité de CO_2 fixée, par unité de surface lipidique membranaire, est très inférieure à ce qu'elle est dans les membranes précédentes et nos hypothèses ne semblent plus pouvoir s'appliquer.

Si on exprime maintenant la fixation de CO_2 par unité PS II fonctionnelle (ligne 7, Tableau XII) on remarque une concordance des résultats entre la "pulpe" et la feuille. Dans ces deux tissus la réponse photosynthétique est donc proportionnelle au nombre de centres actifs. La très faible efficacité photosynthétique de la région interne du fruit semble donc d'avantage liée au nombre très limité des unités PS II, que due à des blocages au niveau des chaines de transfert

d'électrons depuis l'eau jusqu'au $NADP^+$ ou à une déficience des enzymes responsables des étapes de fixation sombre du CO_2.

Dans cette région du fruit, peu favorisée au niveau des échanges gazeux, la photophosphorylation est peut être principalement cyclique et ne fournit que de l'ATP. ARNON (*) a en effet pu induire ce seul type de phosphorylation, in vitro, en conditions anaérobies, dans des chloroplastes normaux dont il bloquait la phosphorylation acyclique par le DCMU. Il est alors possible d'admettre que dans des chloroplastes adaptés de longue date à ces conditions, les centres PS II deviendraient non fonctionnels et leur nombre se réduirait, les seuls centres PS I étant nécessaires à une phosphorylation cyclique. Puisque diverses formes de ferredoxine ont été mises en évidence (ARNON and Coll. (3)), sans doute spécialisées dans différentes fonctions (réduction du $NADP^+$ pour la fixation du CO_2 dans les cycles de CALVIN ; réduction des nitrates pour la synthèse de protéines ; phosphorylation cyclique), il devrait dans ce cas être possible de détecter des différences au niveau de l'équipement en ferredoxine des divers types de chloroplastes étudiés.

A chaque unité photosystème II fonctionnelle de "Chair" correspond une potentialité de fixation du CO_2 deux fois plus importante que dans les deux autres tissus. Il semble donc que ce tissu présente une activité enzymatique de fixation du CO_2 élevée et que les NADPH et H^+ y soient plus vite réoxydés.

Après avoir tenté de définir biochimiquement et fonctionnellement les membranes vertes photosynthétiques des chloroplastes des deux tissus du fruit par rapport à celles des chloroplastes foliaires, prises comme témoins, nous pouvons conclure à certaines différences significatives. Sur une base constante d'acides gras membranaires et par rapport au matériel d'origine foliaire, on peut caractériser les membranes vertes des tissus du fruit par une extrême pauvreté en matériel membranaire protéique et pigmentaire. Matériel qui se trouve organisé en centres photosynthétiques actifs PS II dans la "chair" et très peu organisé dans la "pulpe". Dans cette dernière région et au contraire de la "chair" les actes photochimiques limitants sont probablement responsables de l'activité photosynthétique faible de ce tissu interne, pourtant riche en pigments chlorophylliens. La forte proportion des acides gras insaturés par rapport aux acides gras saturés (rapport ici égal à 1,5 et 2 au

---

* Séminaire Orsay, Mai 1975

lieu de 1 dans le matériel foliaire), peut être en rapport avec la quantité d'O_2 dissous dans le fruit (HARRIS et JAMES (43)), pourrait conférer à ces thylacoïdes de fruit une plus grande fluidité et les centres actifs pourraient y subir de constants remaniements.

Les thylacoïdes foliaires sont au contraire très riches en chlorophylles et en protéines et relativement pauvres en acides gras. Les centres photochimiques actifs y sont si nombreux que les étapes qui limitent la photosynthèse semblent se situer, dans ce tissu, d'avantage au niveau des étapes sombres de la fixation du CO_2. Sur de telles membranes moins fluides que les précédentes, les centres photochimiques peuvent présenter une organisation plus stable.

Après avoir examiné en détail les réactions claires de la photosynthèse et proposé des modèles fonctionnels des trois types de thylacoïdes étudiés ; nous avons également porté notre attention aux réactions sombres. Les premiers tests enzymatiques de fixation du $^{14}CO_2$ par la RuDP carboxylase avaient toujours donné des résultats (exprimés par mg de chlorophylle) moyens dans la "chair", pourtant douée d'une efficacité photosynthétique exceptionnelle, et toujours nulle pour la "pulpe", qui présentait tout de même une certaine fixation claire, nette de CO_2. Nous avons donc formé l'hypothèse qu'il existait peut être, dans les tissus du fruit, une fixation du CO_2 sur les acides en C-4 par la PEP carboxylase. Nous avons dès lors appliqué scrupuleusement à notre matériel les mêmes tests enzymatiques grâce auxquels SLACK et HATCH (113) distinguaient les plantes en C-3 et les plantes en C-4. Nos tests se sont alors montrés positifs pour les trois tissus étudiés et il nous a été possible de mettre en évidence une forte activité PEP carboxylasique dans la "chair" de la Tomate. Cette région du fruit, par unité de pigment chlorophyllien, présente la même activité RuDP carboxylasique que la feuille, mais de plus une activité PEP carboxylasique deux fois plus forte. La feuille à très faible activité PEP carboxylasique, et dont le rapport activité RuDP carboxylase/activité PEP carboxylase est voisin de 15,7 peut être classée parmi les plantes en C-3 puisque SLACK et HATCH rapportent pour le blé, l'avoine et la betterave des valeurs de l'ordre de 14. La "pulpe" au contraire présente un rapport activité RuDP carboxylase/activité PEP carboxylase de l'ordre de 0,02 qui permet de définir ce tissu comme un tissu en C-4 puisque la canne à sucre, le maïs et le sorghum ont un rapport de 0,024.

Ainsi la très haute efficacité photosynthétique du tissu externe du fruit de Tomate que nous n'avions pas pu jusqu'alors expliquer et que le modèle photosynthétique tracé ne pouvait laisser prévoir, trouverait son explication dans la coexistence des deux enzymes carboxylantes actives à l'intérieur de ce tissu. Cette étude des réactions sombres confirme les idées déjà avancées,que dans les tissus de la feuille la photochimie n'est nullement limitante, mais que l'efficacité photosynthétique relativement faible, peut s'expliquer par certaines déficiences des enzymes responsables des réactions sombres. Dans la "chair" par contre, pourtant moins bien pourvue en unités photosynthétiques système II, les enzymes carboxylantes sont en quantité telles qu'il n'y a aucune limitation au niveau de la fixation de CO_2 et que tous les actes photochimiques peuvent être utilisés avec un rendement maximum. Ceci explique que la quantité de CO_2 fixé rapportée à l'unité photosystème II, soit dans ce tissu très supérieure à ce qu'elle est dans les deux autres (ligne 7 - Tableau XII). Dans la "pulpe", est présente la PEP carboxylase à forte affinité vis à vis du CO_2, mais le nombre des unités photosystème II efficace est si faible qu'il ne suffit pas à conférer à ce tissu une efficacité photosynthétique même moyenne.

Nous n'avons décelé aucune caractéristique ultrastructurale frappante dans les chloroplastes des deux régions du fruit vert. Si toutefois nous retenons d'une part l'idée émise par PHAN (101) selon laquelle les chloroplastes du parenchyme interne de la Pomme seraient des organites partiellement étiolés et si d'autre part, nous rappelons les observations non publiées de DUBERTRET, qui mettent en évidence des changements dans le nombre et la taille des antennes et dans le fonctionnement des centres PS II, suivant les conditions d'éclairement de cultures d'Euglènes. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les faibles conditions d'éclairement dans lesquelles sont placés les chloroplastes de fruit, par rapport à celles dans lesquelles se trouvent les chloroplastes de la feuille (conditions d'autant plus médiocres que les chloroplastes sont plus internes), ne pourraient pas être suffisantes pour assurer l'organisation d'un nombre normal de centres actifs sur les membranes des thylacoïdes. Dans de telles conditions, où la probabilité des actes photochimiques devient limitante, un phénomène de compensation pourrait se manifester à l'intérieur des tissus. Il consisterait en la mise en oeuvre d'une enzyme (PEP carboxylase) fixant le CO_2 plus facilement que l'enzyme

du cycle de CALVIN (RuDP carboxylase). Cette PEP carboxylase, à haute affinité pour le CO_2 pourrait être devenue la seule enzyme réellement active pour la fixation du CO_2, dans les cas limites (exemple de la "pulpe"), où la probabilité des actes photochimiques devient très mauvaise par suite d'un nombre très faible de centres photochimiques actifs, organisés sur des membranes qui reçoivent très peu de lumière. On rappelle qu'ARGYROUDI-AKOYUNOGLOU (2) a mesuré, dans des feuilles étiolées, une haute activité PEP carboxylasique ; cette activité décroissait au profit de celle de la RuDP carboxylase au cours du verdissement.

Ainsi, à une grande abondance de centres photosynthétiques actifs sur les thylacoïdes (cas de la feuille), correspondrait une fixation de CO_2 par la voie des intermédiaires en C-3. Lorsque les membranes photosynthétiques seraient moins riches en centres actifs, les actes photochimiques seraient utilisés, avec un meilleur rendement pour la photosynthèse, grâce à la mise en oeuvre de l'enzyme PEP carboxylase présentant une forte affinité pour le CO_2. Dans le cas limite où l'organisation sur les membranes photosynthétiques, de centres actifs fonctionnels, est mauvaise (cas de la "pulpe") seule cette dernière enzyme fonctionnerait.

Le Tableau XIII peut donner une illustration de ce mode possible d'adaptation à des conditions photosynthétiques médiocres. Dans ce tableau, nous avons rapporté les activités enzymatiques, non plus au mg de chlorophylle totale, comme c'était le cas Tableau VII mais à l'unité relative fonctionnelle PS II. On remarque de la feuille à la "pulpe", en passant par la situation intermédiaire de la "chair", une diminution par un facteur 10 des possibilités de fixation du CO_2 par la voie de CALVIN, corrélative à une augmentation par un facteur 70 de celle par la voie de HATCH et SLACK.

Il serait intéressant d'effectuer sur les différents tissus des tests d'activité de l'enzyme NAD malique, de façon à vérifier si les acides en C-4 (malate et aspartate) sont ici, comme dans les plantes en C-4, décarboxylés dans les mitochondries pour redonner du CO_2 assimilable au niveau du cycle de CALVIN (KAGAWA et HATCH (56)).

Au terme de cette étude, il apparait possible d'expliquer là encore les différences, observées entre les trois types de chloroplastes

	Feuille	"Chair"	"Pulpe"
Quantité relative de chlorophylle totale par centre PS II (n.moles) (Tableau XII: (4)/(6))	12	5	46
Nombre relatif de centres par mg de chlorophylle totale	83	200	24
μ moles de CO_2 fixées . min^{-1}. mg^{-1} de chlorophylle totale (Tableau VII) :			
- sur la RUDP	2,05	2,48	0,06
- sur la PEP	0,13	5,33	2,68
μ moles de CO_2 fixées . min^{-1}. en quantité relative par centre PS II :			
- sur la RuDP	24,7	12,4	2,5
- sur la PEP	1,6	26,6	111,7

TABLEAU XIII - Activités de la RuDP carboxylase et de la PEP carboxylase, exprimées par unité fonctionnelle PS II dans chacun des trois tissus verts de feuille, de "chair" et de "pulpe". (Quantités relatives).

étudiés, par des raisons plus ontogéniques ou topologiques que génétiques. En effet, si nous avons déjà invoqué une relation possible entre la quantité de centres actifs organisés sur les membranes photosynthétiques et la quantité de lumière reçue par ces mêmes membranes, nous pouvons maintenant tenter d'appliquer à notre matériel les résultats de HATCH et SLACK (47) qui observent une fixation en C-4 opérante dans des tissus soumis à de fortes tensions en CO_2. On peut pour cela invoquer une plus grande richesse en CO_2 des tissus du fruit que des tissus de la feuille, et cela d'autant plus que le tissu est plus interne : le fruit sphérique de Tomate est en effet limité par une cuticule peu perméable aux échanges gazeux.

5. - CONCLUSION

Cette étude permet de conclure à une véritable dualité structurale et métabolique des deux régions externe et interne du fruit de Tomate "cerise". L'analyse, par rapport aux chloroplastes foliaires, a en outre révélé chez le fruit vert, des spécificités biochimiques et fonctionnelles des deux types de chloroplastes qui conduisent à deux types de chromoplastes distincts lors de la maturation.

Nous avons montré que durant la maturation la région interne ou "pulpe" n'accumule que du β-carotène : dans cette région les chloroplastes se transforment en chromoplastes à globules. Pendant le même temps la région externe ou "chair" s'enrichit à la fois en β-carotène et en une quantité 15 à 20 fois supérieure de lycopène et de phytofluène. Les chloroplastes de ce tissu évoluent en chromoplastes contenant en plus des globules de β-carotène, de larges plaques cristallines de lycopène.

Nous avons par ailleurs mis en évidence la persistance dans les fractions membranaires isolées des chromoplastes, d'espèces polypeptidiques et de catégories lipidiques (galactosyldiglycérides et phosphatidylglycérol) caractéristiques des thylacoïdes verts. Ainsi avons nous confirmé l'hypothèse, avancée à partir de nos observations ultrastructurales, selon laquelle les caroténoïdes s'accumulent dans les lumens de membranes thylacoïdiennes.

La dualité des deux régions du fruit existe dans les chloroplastes dès le stade vert, puisque l'efficacité photosynthétique, exprimée par rapport à la même quantité de chlorophylle et mesurée

sur les tissus excisés, est 17 fois plus faible dans la "pulpe" que dans la "chair".

Un examen plus détaillé a montré que la proportion des pigments chlorophylliens non collecteurs de lumière lors du fonctionnement des centres photosystème II est grande dans les thylacoïdes des chloroplastes de la "pulpe". Au contraire, dans le cas de la "chair", dont les thylacoïdes contiennent des quantités comparables de pigments chlorophylliens, ces derniers collectent correctement la lumière lors du fonctionnement des centres photosystème II. On détermine dans le tissu externe du fruit un nombre de centres PS II 8 fois plus grand en quantité relative que dans la "pulpe".

A partir des données biochimiques et fonctionnelles obtenues nous avons proposé des modèles de ces deux types de membranes chloroplastiques par référence à celles caractéristiques de la feuille.

La très haute efficacité photosynthétique du tissu externe du fruit vert peut de plus être expliquée par la présence, sous leurs formes actives, des deux enzymes fixatrices du CO_2 (PEPcarboxylase et RuDPcarboxylase) alors que la "pulpe et la feuille peuvent être respectivement définies comme des tissus en C-4 et en C-3 (selon SLACK et HATCH (113)).

V. BIBLIOGRAPHIE

1 - ANDERSON JAN, M., LEVINE, R.P. (1974).- Membrane polypeptides of some higher plant chloroplast. Biochim., Biophys., Acta. 333, 378-387.

2 - ARGYROUDI-AKOGUNOGLOU, J.H. (1974).- On the formation of photosynthetic membranes in Phaseolus vulgaris. Thèse de Doctorat es Sciences Chimiques, Université de Liège.

3 - ARNON, D.I., TSUJIMOTO, H.Y., McSWAIN, B.D. and CHAIN, R.K. (1968).- Séparation of two photochemical systems of photosynthesis by fractionation of chloroplasts, p. 113-132. Univ. of Tokyo Press, Tokyo, Univ. Park Press State college, Pennsylvania.

4 - ARNTZEN, C.J., DILLEY, R.A. and CRANE, F.L. (1969).- Comparison of chloroplast membrane surfaces visualised by freeze-etch and negative staining techniques, obtained from digitonin-treated spinach chloroplasts. J. Cell Biol., 43, 16-31.

5 - AUDIGIE, C. (1958).- Etude préliminaire sur la séparation, l'identification et le dosage des pigments liposolubles de la poire Passe-Crassane au cours de sa maturation. Rev. Gén. Bot. 65, 581-601.

6 - BEAN, R.C., PORTER, C.G. and BASS, B.K. (1963).- Photosynthesis and respiration in developing fruits. III. Variation in Photosynthesic capacities during color change in citrus. Plant Physiol. 38, 285-

7 - BEAN, R.C. and TODD, G.W. (1960).- Photosynthesis and respiration in developing fruits. I. $^{14}CO_2$ uptake by young oranges in light and dark. Plant Physiol. 35, 425-

8 - BEN-SHAUL, Y., NAFTALI, Y. (1969).- The development and ultrastructure of lycopene bodies in chromoplasts of Lycopersicum esculentum. Protoplasma, 67, 333-344.

9 - BENSON, A.A., DANIEL, H. and WISER, R. (1959).- Sulfolipid in plants. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 45, 1582-1587.

10 - BIALE, J.B. (1960).- Respiration of fruits. Handbuch der Pflanzenphysiologie, Vol. XII (2), 536-604. W. Ruhland Ed. Berlin, Springer-Verlag.

11 - BIALE, J.B. and SOLOMOS, T. (1974).- Respiration and fruit ripening. Colloques Internationaux du CNRS n° 238 : Facteurs et régulation de la maturation des fruits.

12 - BISHOP, D.G. (1974).- Lamellar structure and composition of chloroplasts in relation to photosynthetic electron transfer. Photochem.Photobiol., 20, 281-299.

13 - BLIGH, E.G., DYER, W.S. (1959).- A rapid method of total lipid extractionand purification. Can. J. Biochem. Biophys. 37, 911-917.

14 - CHICHESTER, C.O., NAKAYAMA, T.O.M. (1965).- Pigment changes in senescent and stored tissue. Chem. and Biochem. of Plant pigments. T.W. Goodwin Ed. N.Y. Acad. Press. p. 440-461.

15 - CHOE, H.T. and THIMAN, K.V. (1974).- The senescence of isolated chloroplasts. Planta, 121, 201-203.

16 - CLIJSTERS, H. (1974).- Relation possible entre l'activité photosynthétique de la pomme et sa maturation. Colloque CNRS n° 238 : Facteurs et régulation de la maturation des fruits.

17 - CONN, E.E. and STUMPF, P.K. (1972).- Outlines of Biochemistry, 3rd edition, John Wiley and Sons Ed. New York - London - Sidney - Toronto, p. 357.

18 - COSTES, C. (1966).- Biosynthèse du phytol des chlorophylles et du squelette tétraterpénique des caroténoides dans les feuilles vertes. Phytochem., 5, 311-324.

19 - COSTES, C., BAZIER, R., et EVRARD, C. (1973).- Recherches sur la stabilité des chloroplastes sous la lumière artificielle : effets de l'éclairement sur les pigments et sur les lipides. Physiol.Vég.11, 301-326.

20 - DELAPORTE, N. et LAVAL-MARTIN, D. (1971).- Analyse spectrophotomètrique des chlorophylles et des pheophytines a et b en milieu hydroacétonique. I. Détermination des extinctions molaires. Analytica Chim. Acta. 55, 415-425.

21 - DELAPORTE, N. et LAVAL-MARTIN, D. (1971).- Analyse spectrophotomètrique des chlorophylles et des pheophytines a et b en milieu hydroacétonique. II. Méthode cinétique de dosage. Analytica Chim. Acta,55,425-435.

22 - DELAPORTE, N. et LAVAL-MARTIN, D. (1972).- Formes acides des chlorophylles et des pheophytines a et b : étude potentiomètrique et spectrophotomètrique. Analusis, 1, 289-293.

23 - DELAPORTE, N.et LAVAL-MARTIN, D. (1972).- Etude spectrophotomètrique des phénomènes de phéophytinisation des chlorophylles a et b en milieu hydroacétonique. Chim. Anal. 54, 167-172.

24 - DEVIDE, Z. and LJUBESIC, N. (1974).- The reversion of chromoplast to chloroplasts in pumpkin fruits. Z. Pflanzenphysiol. 73, 296-

25 - DURAND, M. et LAVAL-MARTIN, D. (1974).- Séparation en chromatographie sur couches minces des dérivés chlorophylliens tetrapyrroliques et application à la recherche de ces dérivés dans un fruit en cours de maturation. J. Chromatogr. 97, 92-98.

26 - DUYSENS, L.N.H. and SWEERS, H.E. (1963).- Microalgae and photosynthesis bacteria. Univ. of Tokyo Press - Tokyo - 353-372.

27 - EILATI, S.K., GOLDSCHMIDT, E.E. and MONSELISE, S.P. (1969).- Hormonal control of colour changes in Orange Peel. Experientia, 25, 209-

28 - EYME, J. (1971).- La structure des plastes dans les parenchymes des coupes receptaculaires florales du pêcher Prunus persica chez les variétés à fruits à chair blanche et jaune. C.R. Acad.Sci. Paris, 272, 1232-1235.

29 - FALK, H., LIEDVOGEL, B. and SITTE, P. (1974).- Circular DNA in isolated chromoplasts. Naturforsch. 29c, 541-544.

30 - FLEURIET, A. et MACHEIX, J.J. (1974).- Relations entre la maturation accélérée de fruits blessés et leur teneur en composés phénoliques. Colloques Internationaux du CNRSn° 238 : Facteurs et régulation de la maturation des fruits.

31 - FORTINO, J. and SPLITTSTOESSER, W.E. (1974).- Lycopene induction in cucurbita moschata cotyledons by CPTA. Plant cell Physiol. 15, 59-62.

32 - FREY-WYSSLING, A. and KREUTZER, E. (1958).- The submicroscopic development of chromoplasts in the fruit of Capsicum annum L. J. Ultrastr. Res. 1, 397-411.

33 - FREY-WYSSLING, A. and KREUTZER, E. (1958).- Die submikroscopische Entwicklung der chromoplasten in den Blutten von Ranunculus repens. Planta, 51, 104-114.

34 - FREY-WYSSLING, A. and SCHWEGLER, F. (1965).- Ultrastructure of the chromoplasts in the carrot Root. J. Ultrastruct. Res., 13, 543-559.

35 - GALLER, M. and MacKINNEY, G. (1965-1966).- Carotenoïds of certain fruits (apple, pear, cherry, strawberry). J. Sci. Fd Agric., 17, 1-196.(1966) J. Fd Sci. 30, 393-395 (1965).

36 - GARDNER, R. (1961).- Quality in Totatoes. Agriculture Lond. 68, 125-129.

37 - GEROLA, F.M., CRISTOFORI, F. and DASSU, G. (1960).- a:Ricerche sulle infrastructure della cellule del mesofillo fogliare di piante sane e virosate di tabacco. (Nicotiana tabacum). Caryologia, 13, 352-378.

38 - GOODENOUGH, V.W. and STAEHELIN, L.A. (1971).- Structural differenciation of sracked and unstacked chloroplast membranes. J. Cell.Biol., 48, 594-619.

39 - GOVINDJEE and GOVINDJEE, R. (1974).- The primary events of photosynthesis. Scient. Am. 231, 68-82.

40 - GRONEGRESS, P. (1971).- The greening of chromoplasts in Daucus carota L. Planta, 98, 274-278.

41 - HALL, C.B. (1964).- Firmness and color of some tomato varieties during ripening and according to harvest dates. Proc.Amer. Soc. Hort. Sc. 84, 501-

42 - HALL, J.D., BARR, R., H.AL-ABBAS and CRANE, F.L. (1972).- The ultrastructure of chloroplasts in mineral deficient maize leaves. Plant Physiol. 50, 404-409.

43 - HARRIS, P. and JAMES, A.T. (1968).- The effect of low temperatures on fatty acid biosynthesis in plants. Biochem. J., 112, 325-330.

44 - HARRIS, W.M. and SPURR, A.R. (1969).- Chromoplasts of tomato fruits. I. Ultrastructure of low-pigments and high-beta mutants. Carotene analyses. Amer. J. Bot. 86, 369-379.

45 - HARRIS, W.M. and SPURR, R.A. (1969).- Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. Amer. J. Bot., 56, 380-389.

46 - HARWOOD, J.L, SODJA, A. and STUMPF, P.K. (1971).- On the origin of oil droplets in maturing castor bean seeds. Ricinus communis. Lipids, 6, 851-854.

47 - HATCH, M.D. and SLACK, C.R. (1970).- Photosynthese CO_2 fixation. Plant Physiol. 21, 141-

48 - HAVERKATE, F. and VAN DEENEN, L.L.M. (1965).- Isolation and chemical characterization of phosphatidylglycerol from spinach leaves. Biochim.Biophys. Acta, 106, 70-92.

49 - HENRIQUES, F. and PARK, R. (1974).- Biosynthesis of grana and stroma lamellae in spinach. Plant Physiol. 54, 386-391.

50 - HOBSON, G.E. (1974).- Protein redistribution and tomato fruit ripening. Colloques Internationaux du CNRS n° 238: Facteurs et régulation de la maturation des fruits.

51 - HOOBER, J.K., SIEKEVITZ, P. and PALADE, G. (1969) - Formation of chloroplast membranes in Chlamydomonas reinhardi y. I. Effects of inhibitors of protein synthesis. J. Biol. Chem. 244, 262-263.

52 - JAMES, A.T. and MARTIN (1952).- Gas liquid partition chromatography: the separation and microestimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. J. Biochem. 50, 679-690.

53 - JOLIOT A. and JOLIOT, P. (1964).- Etude cinétique de la réaction photochimique libèrant l'oxygène au cours de la photosynthèse. C.R. Acad.Sc. Paris, 258, 4622-4625.

54 - JOLIOT, P., BENNOUN, P. and JOLIOT, A. (1973).- New evidence supporting energy transfer between photosynthetic units. Biochim. Biophys. Acta, 305 317-328.

55 - JONES, H.G. and OSMOND, C.B. (1973).- Photosynthesis by thin leaf slices in solution. I. Properties of leaf slices and comparison with whole leaves. Aust. J. Biol. Sci. 15-24.

56 - KAGAWA, T. and HATCH, M.D. (1974).- C_4 acid as the source of carbon dioxide for calvin cycle photosynthesis by bundle sheath cells of the C4 pathway species Atriplex spongiosa. Biochem. Biophys. Res.Commun. 59, 1326-1332.

57 - KALRA, S. and BROOKS, J.L. (1973).- Lipids of ripening Tomato fruit and its mitochondrial fraction. Phytochem. 12, 487-492.

58 - KELLY, J. and SAUER, K. (1965).- Action spectrum and quantum requirements for the photoreduction of cytochrome c with spinach chloroplasts. Biochemistry, 4, 2798-2802.

59 - KHUDAIRI, A.K. (1972).- The ripening of tomatoes. A molecular ecological approach to the physiology of fruit ripening. Amer. Scient. 60, 696-707.

60 - KLEIN, S.M. and VERNON, L.P. (1974).- Protein composition of spinach chloroplasts and their photosystem I and photosystem II subfragments. Photochem. Photobiol. 19, 43-49.

61 - KNEGT, E., KRANER, S.J., BRUINSMA, J. (1974).- Pectin changes and internal ethylene concentrations in ripening tomato fruit. Colloques internationaux du CNRS n° 238 : Facteurs et régulation de la maturation des fruits.

62 - KUHN, H. (1970).- Chemismus Struktur und Entstehung der Carotinkristâllchen in der Nebenkrone von Narcissuspoeticus L. var. "La Riante". J. Ultrastr. Res. 33, 332-355.

63 - KUSHWAHA, S.C., SUZUE, G., SUBBARAYAN, C. and PORTER, J. (1970).- The conversion of phyotene ^{14}C to acyclic monocyclic and dicyclic carotènes and conversion of lycopene-15,15'-^{3}H to mono and dicyclic carotenes by soluble enzyme systems obtained from plastids of tomato fruits. J. Biol. Chem. 245, 4708-4714.

64 - LABORDE, J.A. and SPURR, A.R. (1973).- Chromoplast ultrastructure as affected by genes controling grana retention and carotenoids in fruit of Capsicum annum. Amer. J. Bot. 60, 736-744.

65 - LANCE-NOUGAREDE, A. (1960).- Développement inframicroscopique des chromoplastes au cours de l'ontogenèse des fleurs ligulées de Chrysanthemum sagetum. C. R. Acad. Sci. Paris, 250, 173-175.

66 - LAVAL-MARTIN, D. (1966).- Les Chlorophylles a et b durant la maturation de la Poire "Passe-Crassane". D.E.S. de Physiologie Végétale appliquée, Paris, Fév. 1966.

67 - LAVAL-MARTIN, D. (1968).- Etude critique de quelques méthodes de dosage spectrophotomètrique des chlorophylles a et b. D.E.A. Physiol. Vég. appliquée, Paris.

68 - LAVAL-MARTIN, D. (1969).- Variations de la teneur en chlorophylles au cours de la maturation et en fonction de la température chez la Poire "Passe-Crassane". Physiol. Vég., 7, 251-259.

69 - LAVAL-MARTIN, D. (1969).- Evolution des pigments et des plastes au cours de la maturation de la tomate "cerise". Bull. Soc. Physiol. Vég. 15, 77-97.

70 - LAVAL-MARTIN, D., QUENNEMET, J. et MONEGER, R. (1972).- Sur l'évolution des caroténoïdes et des chlorophylles du fruit de tomate "cerise" pendant sa croissance et sa maturation. C.R.Acad. Sci.Paris, 274, 2879-2882.

71 - LAVAL-MARTIN,D., QUENNEMET, J. et MONEGER, R. (1974).- Remarques sur l'évolution lipochromique et ultrastructurale des plastes durant la maturation du fruit de tomate "cerise". Coll. Intern. du CNRS n° 238, Juillet 1974 Paris : Facteurs et régulation de la maturation des fruits.

72 - LAVAL-MARTIN, D. (1974).- La maturation du fruit de tomate "cerise" : mise en évidence, par cryodécapage, de l'évolution des chloroplastes en deux types de chromoplastes . Protoplasma, 82, 33-59.

73 - LAVAL-MARTIN, D., QUENNEMET, J. and MONEGER, R. (1975).- Pigment in evolution in fruits of Lycopersicum esculentum variety cerasiforme during growth and ripening. Phytochemistry, sous presse.

74 - LEFORT, M. (1964).- Etude des relations entre l'infrastructure plastidiale d'un mutant de Chlorella vulgaris et la lumière. Discussion sur les liaisons pigments-structures lamellaires. Communications, Physiol.Vég.

75 - LEPAGE,M. (1967).- Identification and composition of turnip root lipids. Lipids, 2, 244-250.

76 - LEVINE, R.P., BURTON, W.G. and DURAM, H.A. (1972).- Membrane polypeptides associated urth photochemical systems. Nature New Biol. 237, 176-177.

77 - LICHTENTHALER, H.K. and PARK, R. (1968).- Chemical composition of chloroplast lamellae from spinach. Nature, 198, 1070-1072.

78 - LICHTENTHALER, H.K. and TEVINI, M. (1970).- The distribution of pigments, plastoquinones and pastoglobuli in different particle fractions obtained from sonicated spinach chloroplast. Z. Pflanzenphysiol., 62, 33-50.

79 - LICHTLE, C. (1973).- Dégénérescence du Rhodochorton Purpureum (Lighft). Rosenvinge, Rhodophycée, Acrochaetiale, C.R. Acad. Sc. Paris, 277, 2341-

80 - LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, N.J. and RANDALL, R.J. (1951).- Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

81 - MacEVOY, F.A. and LYNN, W.S. (1973).- The peptides of chloroplast membranes. I. The soluble coupling factor (Ca^{2+}-ATPase). Arch. Bioch.Biophys. 156 335-341.

82 - MAHLER, H.R. and CORDES, E.M. (1966-1967).- Biosynthesis of steroids. p.644 Biological Chemistry. Harper and Row N.Y. Evanston - London and B. Weatherhill J. Onc. Tokyo.

83 - MALKIN, S. a,d KOK, B. (1966).- Fluorescence induction studies in isolated chloroplasts. I. Number of components involved in the reaction and quantum yields. Biochim. Biophys. Acta, 126, 413-432.

84 - MARKS, J.D., BERNLOHR, R. and VARNER, J.E. (1957).- Esterification of phosphate in ripening fruit (Tomato). Plant Physiol. 32, 259-262.

85 - MARZIANI, G., ORSENICO, M. (1965).- Observations of the fine structure of the plastids in a lycopenic mutant of maize. ATT. Ve Congres Italien Microsc. Electron., 158-161.

86 - MAZLIAK, P. (1965).- Les acides gras du parenchyme de pomme: I. Analyse des acides gras (nouvelles techniques) Fruits. 20, 559-564.

87 - MAZLIAK, P., CATESSON, A.M. (1968).- Metabolisme des lipides dans le parenchyme externe de l'épiderme des pommes. II. Evolution de la lipogénèse au cours de la croissance des fruits; relation avec la morphologie des plastes. Fruits, 23, 247-257.

88 - MENKE, W. RADUNZ, A. and KOENIG, F. (1973).- Membrane and vesicle formation from fragments and proteins of thylakoïds. Z. Natursforch. 28, 63-65.

89 - MEYER, A. (1833).- Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer. Berziehung. Leipzig: Arthur Felix Verlag.

90 - MITTELHEUSER, C.J. and Von STEVENICK, R.F.M. (1971).- The ultrastructure of leaves. I. Changes due to natural senescence and the effects of Kinetin and ABA on detached leaves incubated in the dark. Protoplasma, 73, 239-252.

91 - MONEGER, R. (1956).- Méthode pour l'étude quantitative de l'évolution des pigments liposolubles au cours de la maturation des fruits et du jaunissement des feuilles. DES Physiol. Vég. Paris.

92 - MONEGER, R. (1968).- Un exemple d'application des techniques du froid en physiologie végétale. Mise au point d'une méthode pour analyser les effets de la lumière sur la synthèse des caroténoïdes chez les végétaux étiolés. Rev. Gén. Froid, n° 4, Avril 1968.

93 - MORRIS, L.J., WHARRY, D.N. and HAMMOND, W.E. (1967).- Chromatographic behaviour of isomeric long chain aliphatic compounds. II. Argentation thin layer chromatography of isomeric compounds. J. Chromatogr. 31 69-76.

94 - MURAKAMI, S. and NOBEL, P.S. (1967).- Lipids and light dependent swelling of isolated spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 8, 657-671.

95 - NELSON, N., DETERS, D.W., NELSON, H. and RACKER, E. (1973).- Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation . XIII. Properties of isolated subunits of coupling factor 1 from spinach chloroplasts. J. Biol. Chem. 248, 2049-2055.

96 - NEWMAN, D.W. (1966).- Chloroplast fatty acid transformation in nitrogen deficient and senescent tissues. Plant Physiol. 41, 328-334.

97 - NICHOLS, B.W., STUBBS, J.M. and JAMES, A.T. (1966).- Lipid composition and ultrastructure of chloroplasts. Biochem. of Chloroplasts, 677-690. T.W. Goodwin Edit. Acad. Press - London - Vol. 1.

98 - OSHIO, Y and HASE, E. (1969).- Studies on red pigments excreted by cells of Chlorella protothecoides during the process of fleaching induced by glucose or acetate. II. Mode of formation of the red pigments. Plant Cell Physiol., 10, 51-59.

99 - PAPASTEPHANOU, C., BARNES, F.T., BRIEDIS, A.V. and PORTER, J.W. (1973).- Enzymatic synthesis of carotenes by cell-free preparations of fruit of several genetic selections of tomatoes. Arch. Biochem. Biophys. 157, 415-425.

100 - PHAN, C.T. (1973).- Chloroplasts of the Peel and the internal tissues of Apple-fruits. Experientia, 29, 1555-

101 - PHAN, C.T. (1974).- Occurence of active chloroplasts in the internal tissues of apples. Their possible role in fruit maturation. Colloques internationaux du CNRS n° 238 : Facteurs et régulation de la maturation des fruits.

102 - RAMIREZ, D. and TOMES, M.L. (1964).- Relation between chlorophyll and carotenoid biosynthesis in dirty red (freen flesh) mutant in tomato. Bot. Gaz. 125, 221-226.

103 - REMY, R. (1971).- Resolution of chloroplast lamellar proteins by electrophoresis in polyacrylamide gels. Different patterns obtained with fractions enriched in either chlorophyll a or chlorophyll b. FEBS Lett. 13, 313-317.

104 - ROMANI, R.J., YU, I.K., KU, L.L., FISCHER, L.K. and DEHGAN, N. (1968).- Cellular senescence radiation damage to mitochondria and the compensatory response in ripening Pear Fruit. Plant Physiol. 43, 1089-1096.

105 - ROSSO, S.W. (1967). An ultrastructural study of the mature chromoplasts of the tangerine tomato. J. Ultrastr. Res. 20, 179-189.

106 - ROSSO, S.W. (1968).- The ultrastructure of chromoplast development in red tomatoes. J. Ultrastr. Res. 25, 307-322.

107 - SAVELLI, R. (1937).- Sur la distribution des carotenoïdes rouges dans les chromoplastes. Protoplasma, 29, 601-

108 - SCHIMPER, A.F.W. (1883). Über die Entschung der Chlorophyll körner und Farbkörper. Bot. Z., 41, 105-121, 137-153.

109 - SIDWELL, A.P., BIRTH, G.S., ERNEST, J.V. and GOLUMBIC, C. (1961).- The use of light transmittance techniques to estimate the chlorophyll content and stage of maturation of Elberta peaches. Food technol. 15, 75-78.

110 - SIMPSON, D.J., RANDAN, F.M.M., BUCKLE, K.A. and LEE, T.N. (1974).- Chemical reculation of plastid development. II. Effect of CPTA on the ultrastructure and carotenoid composition of chromoplasts of Capsicum annum cultivars. Aust. J. Plant Physiol. 1, 135-147.

111 - SINGER, S.J. (1974).- The molecular organization of membranes. Ann. Rev. Biochem. 43, 805-833.

112 - SITTE, P. (1974).- Plastid metamorphosis and chromoplasts in chrysoplenium. Pflanzenphysiol. 73, 5243-5265.

113 - SLACK, C.R. and HATCH, M.D. (1967).-Comparative studies on the activity of carboxylases and other enzymes in relation to the new pathway of photosynthétic carbon dioxide fixation in tropical grasses. Biochem. J., 103 660-665.

114 - SPENCER, M. (1965).- Fruit ripening. Plant Biochem. J. Bonner and J.E. Varner Edits. N.Y. Acad. Press. 793-826.

115 - SPURR, A.R. and HARRIS, W.M. (1968).- Ultrastructure of chloroplasts and chromoplast in Capsicum annum. I. Thylakoid membrane changes during fruit ripening. Amer. J. Bot. 55, 1210-1224.

116 - STEFFEN, J. and WALTER, F. (1958). Die chromoplasten von Solanum capsicastrum L. Und ihre genese Elektronenmikroskopische Untersuchun gen zur plastidenmetamorphose. Planta, 50, 640-670.

117 - STRAUS, W. (1956).- Isolation of chromoplast from carrots. Exp. Cell Res, 11, 289-296.

118 - THOMPSON, A.E. (1961).- A comparison of fruit quality constituents of normal and high pigment tomatoes. Proc. Amer. Soc. Hort. Sc. 78, 464-473.

119 - THOMSON, W.W. (1966).- Ultrastructure development of chromoplasts in Valencia oranges. Bot. Gaz. 127, 133-139.

120 - THOMSON, W.W., LEWIS, N.N. and COGGINS, C.W. (1967).- The reversion of chromoplasts in Valencia oranges. Cytologia, 32, 117-123.

121 - THOMSON, W.W. and PLATT, K. (1973).- Plastid ultrastructurale in the barrel cactus, Echinocactus acanthodes. New Phytol., 72, 791-793.

122 - TREMOLIERES, A. (1970).- Les lipides des tissus photosynthétiques. Ann. Biol. 9, n° 3-4.

123 - TREMOLIERES, A. (1974).- La différenciation des apparails photosynthétiques au cours de la croissance et du verdissement des feuilles. Ann. Biol. 13, n° 11-12.

124 - TRUDEL, M.J. and OZBUN, J.L. (1970).- Relationship between chlorophylls and carotenoids or ripening Tomato fruit as influence by K nutrition. J. Exp. Bot. 21, 881-886.

125 - VALADON, L.R.G. and MUMMERY, R.S. (1972).- Carotenoids of Rowan berries. Ann. Bot. 36, 471-474.

126 - WALLACE, J.W. and NEWMAN, D.W. (1965).- Lipids of proplastids and nitrogen deficient chloroplasts. Phytochemistry, 4, 43-47.

127 - WALLES, B. (1971).- Chromoplast development in a carotenoid mutant of maize. Protoplasma, 73, 159-175.

128 - WEIER, T.E. and BENSON, A.A. (1966).- The molecular nature of chloroplast membranes. Biochemistry of Chloroplast, Vol. I, 91-113, (T.V. Goodwin, London, New York. Academic Press).

129 - WILLMER, C.M., PALLAS, J.E. Jr. and BLACK, C.C.Jr. (1973).- Carbon dioxide metabolism in leaf Epidermal Tissue. Plant Physiol. 52, 448-452.

130 - WORKMAN, M. and PRATT, H.K. (1957).- Studies on the physiology of Tomato fruits. II. Ethylene production at 20°C as related to respiration ripening and date of harvest. Plant Physiol. 32, 330-334.

131 - WORKMAN, M. (1963). - Color and pigment changes in Golden Delicious and Grimes Golden Apples. Proc. Amer. Soc. Hort. Sc. 83, 149-161.

132 - FORBUSH, B. and KOK, B.(1968).- Reaction between primary and secondary electron acceptors of photosystem II of photosynthesis. Biochim.Biophys. Acta, 162, 243-253.

133 - LAEMMLI, V.K. (1970).- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.

134 - MOOR, H. (1964).- Freeze etching technique. J. Appl. Phys. 35, 3077-

Service de Reprographie
C.N.R.S.
Gif